

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Knockdown der zirkulären RNA circARID1A induziert
Differenzierung und Apoptose in Neuroblastom Zelllinien.

Knockdown of the circular RNA circARID1A induces Differentiation
and Apoptosis in Neuroblastoma Cell Lines.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Clara Danßmann
aus Berlin

Datum der Promotion: 03.03.2023

Vorwort

Teile dieser Arbeit wurden auf Kongressen präsentiert und folgende zugehörige *Abstracts* wurden publiziert (Details siehe Anteilserklärung):

Klironomos F, Danssmann C, Naderi J, Winkler A, Luz U, Hundsdoerfer P, Eggert A, Toedling J, Hertwig F, Schulte JH, Fuchs S. **Circular RNAs contribute to Neuroblastoma pathogenesis.** *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019; 2019 Mar 29-Apr 3; Atlanta (GA), USA. AACR; Cancer Research 2019;79(13 Suppl): Abstract nr 1820.*

Danssmann C, Toedling J, Klironomos F, Winkler A, Hertwig F, Eggert A, Schulte JH, Fuchs S. **Circular RNAs in Neuroblastoma.** *31th Annual Meeting of the Kind-Philipp- Stiftung for pediatric oncologic Research.* June 6-9, 2018, Wilsede. *Klin Padiatr* 2018; 230(03): 169.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	i
Inhaltsverzeichnis.....	ii
Akürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung.....	5
Abstract	7
1 Einleitung	9
1.1 Das Neuroblastom ist ein heterogener Tumor des Kindesalters	9
1.2 Nichtkodierende RNAs bilden ein komplexes regulatorisches Netzwerk	12
1.3 Zirkuläre RNAs sind eine neue Klasse von ncRNAs.....	13
1.4 Zirkuläre RNAs im Neuroblastom	17
1.5 Fragestellung	21
2 Material und Methodik.....	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Kits.....	23
2.1.3 Chemikalien.....	23
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	24
2.1.5 Enzyme und zugehörige Puffer	26
2.1.6 Zellkultur Material.....	26
2.1.7 Verbrauchsmaterial.....	27
2.1.8 Primer und si-RNAs	28
2.1.9 Plasmide.....	29
2.1.10 Antikörper.....	30
2.1.11 Zelllinien und Bakterienstämme.....	30
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Tumorproben	31
2.2.2 Zellbiologie.....	31
2.2.3 Molekularbiologie.....	34
2.2.4 Proteinbiochemie	45
2.2.5 Statistik	46

3 Ergebnisse	48
3.1 Zirkuläre RNAs werden im Neuroblastom exprimiert	48
3.2 Zirkuläre RNAs werden in Neuroblastom Zellen meist niedriger exprimiert als ihre zugehörigen mRNAs	50
3.3 Das Tumorsuppressorgen ARID1A bildet eine zirkuläre RNA mit Lokalisation im Zytoplasma	52
3.4 <i>Knockdown</i> von circARID1A induziert Apoptose und Differenzierung in Neuroblastom Zelllinien	54
3.6 Wiederherstellung der circARID1A Expression macht den Phänotyp nach <i>Knockdown</i> nicht rückgängig	59
4 Diskussion	61
4.1 Zirkuläre RNA werden unabhängig von ihren zugehörigen mRNAs exprimiert.....	61
4.2 Das Tumorsuppressorgen ARID1A bildet eine circRNA mit Lokalisation im Zytoplasma	64
4.3 Knockdown von circARID1A identifiziert diese als Onkogen	65
4.4 Die Überexpression und der <i>Rescue</i> zeigen keinen messbaren Effekt.....	67
4.5 Die Rolle von circARID1A im Muskel und in Autismus-Spektrum-Störungen.....	68
4.6 Limitationen und Ausblick	69
Literaturverzeichnis.....	72
Eidesstattliche Versicherung	85
Lebenslauf	85
Publikationsliste	91
Kongressbeiträge: Vorträge.....	91
Kongressbeiträge: Posterpräsentation und Flashtalk.....	91
Danksagung	93

Akürzungsverzeichnis

3'-UTR	3'untranslated Region
A	Adenosin
AAV	Adeno-associated Virus
ADAR1	Adenosine Deaminase Acting on RNA 1
Adr	Adrenerg
AG	Arbeitsgruppe
AGO2	Argonaute-2
ALK	Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres (ALT)
ALU	Arthrobacter Luteus
ASOs	Antisense Oligonucleotides
ARID1A	AT-Rich Interaction Domain 1A
ARID1B	AT-Rich Interaction Domain 1B
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	α -thalassaemia/mental retardation syndrome X-linked
AUC	Area Under The Curve
BIMSB	Berlin Institute for Molecular Medicine
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	Copy DNA
CDR1	Cerebellar Degeneration-Related protein 1
CDR1as	CDR1 antisense
circRNA	Circular RNA
ciRS-7	circular RNA sponge for miR-7
Ctrl	Control (Kontrolle)
CT	Computertomographie
CUX1	CUT-like homeobox 1
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid

dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
EIciRNAs	Exon-Intron-circular RNA
EIF4A3	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A3
EMT	epithelial-mesenchymalen Transition
EWSR1	EWS RNA-binding protein 1
FCS	Fetal Calf Serum
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
FOX2	Forkhead box P2
FOXO3	Forkhead box O3
FUS	FUS RNA Binding Protein
G	Guanin
GalNAc	N-Acetylgalactosamine
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HuR	Human antigen R
IGF2BP1	Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1
IGF2BP2	Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2
IGF2BP3	Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 3
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IRES	Internal ribosome entry sites
lncRNA	long-non-coding RNA
LNP	Lipid Nanoparticle
MAZ	MYC-associated zinc finger protein
MBL	Muscleblind
Mes	Mesenchymal
MIBG	Metaiodbenzylguanidin
miRNA	Micro RNA
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA

MAP2	Microtubule Associated Protein 2
MRT	Magnetresonanztomographie
MYCN	N-myc Proto-oncogene Protein
NBAT1	Neuroblastoma Associated Transcript 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncRNAs	Non-coding RNAs (ncRNAs)
NEFL	Neurofilament Light
NES	Nestin
OMAS	Opsomyoklonus-Ataxie-Syndrom
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHOX2B	Paired-like homeobox 2b
PTB	Polypyrimidine Tract Binding Protein
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QKI	Quaking
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcriptase PCR
RBP	RNA Bindeproteinen
REAP	Rapid, Efficient & Practical Cell Fractionation
RISC	RNA-induced silencing complex
RLU	Relative Light Unit
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RNU6B	Small Nuclear RNA U6B
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SCR	Scrambled
SDHA	Succinate Dehydrogenase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SHPRH	SNF2 histone linker PHD RING helicase
SIN3A	SIN3 transcription regulator family member A
siRNA	Small Interfering RNA
SLC45A4	Solute Carrier Family 45 Member 4

snRNA	Small nuclear RNA
SOX9	SRY-Box Transcription Factor 9
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TRIS	Tris-aminomethan
TrkA	Tropomyosin-Rezeptorkinase A
U	Uracil

Zusammenfassung

Hintergrund: Zirkuläre RNAs (circRNAs) bilden eine Klasse nicht-kodierender RNAs, die durch alternatives Spleißen, dem sogenannten *Backsplicing* entstehen und an der Regulation von Genexpression beteiligt sind. Sie werden während der neuralen Differenzierung differenziell exprimiert und sind in vielen Tumorentitäten fehlreguliert. Das Neuroblastom entsteht aus Vorläuferzellen der Neuralleiste und ist der häufigste extrakranielle Tumor des Kindesalters. Zum Zeitpunkt der Diagnose präsentieren sich ca. 50% der Kinder mit einer Hochrisikokonstellation, was mit einer schlechten Prognose einhergeht. Durch RNA Sequenzierung von 104 primären Neuroblastomen konnten 5171 circRNAs identifiziert werden. Hierunter befand sich circARID1A, welche verglichen mit anderen Tumorentitäten und gesunden neuralem Gewebe besonders hoch im Neuroblastom exprimiert wird und in dieser Arbeit funktionell charakterisiert wird.

Methoden: Eine Auswahl von sieben circRNA Kandidaten wurde in Neuroblastom Zelllinien durch qRT-PCR, Sanger Sequenzierung und ein RNase-R-Assay validiert. Ein *Northern Blot* diente der weiteren Validierung von circARID1A. Die Expression von mRNAs und circRNAs wurden mittels qRT-PCR in 11 verschiedenen Neuroblastom Zelllinien analysiert. Durch *Knockdown* Experimente mittels siRNA wurde der Einfluss von circARD1A auf Zellzahlen, Zellviabilität, Proliferation, Apoptose und Differenzierung in den Neuroblastom Zelllinien SH-SY5Y und IMR-5 untersucht. Anschließend wurde ein induzierbares Überexpressionsmodell in der Zelllinie SH-EP generiert und ein *Rescue* Experiment in SH-SY5Y und IMR-5 durchgeführt.

Ergebnisse: Die Ringschlussverbindungen aller untersuchten circRNA Kandidaten konnten erfolgreich amplifiziert und durch Sanger Sequenzierung nachgewiesen werden. Alle Kandidaten bis auf circTet2 zeigten nach RNase-R Behandlung eine höhere Stabilität als ihre zugehörigen mRNAs. In den Expressionsanalysen zeigte sich kein eindeutig erkennbares Muster. Der Großteil der Kandidaten zeigte keine Korrelation zu den jeweils zugehörigen mRNAs. Der *Knockdown* von circARID1A zeigte sich als spezifisch ohne die Expression der *ARID1A* mRNA oder dem Protein zu beeinflussen und hatte in IMR-5 Zellen eine Abnahme der Zellzahlen, der Zellviabilität und der Proliferation zur Folge. Die Zellen zeigten vermehrt Apoptose. SH-SY5Y Zellen bildeten nach *Knockdown* vermehrt Ausläufer und Zell-Zell-Kontakte. Die Überexpression zeigte keinen messbaren Effekt auf SH-EP Zellen. Der Effekt des *Knockdowns* konnte durch das *Rescue* Experiment nicht rückgängig gemacht werden.

Diskussion: Die Sequenzierungsdaten konnten erfolgreich validiert werden. Expressionsanalysen suggerieren einen unabhängigen Mechanismus von der circRNA und mRNA Bildung. Wir identifizierten circARID1A als Neuroblastom-spezifische circRNA. *Knockdown* Experimente deuten auf tumorfördernde Eigenschaften von circARID1A im Neuroblastom hin. Zusammenfassend zeigt diese Studie die Relevanz von circRNAs im Neuroblastom am Beispiel von circARID1A. Dies kann bei der weiteren Entschlüsselung der Rolle von circRNAs im Neuroblastom und ihrer Etablierung als neue therapeutische Zielstrukturen und Biomarker helfen.

Abstract

Background: Circular RNAs (circRNAs) are a class of non-coding RNA, which originate from alternative splicing, termed backsplicing and contribute to gene expression regulation. They are highly abundant in neural tissues and play a role in cancer biology. Neuroblastoma develops from progenitor cells of the neural crest and is the most common extracranial tumor in childhood. Unfortunately, about 50% of the children present with high-risk disease at time of diagnosis. Performing Total RNA sequencing 5171 circRNAs were identified in 104 primary neuroblastoma samples. Among them was circARID1A. CircARID1A was upregulated in neuroblastoma compared to other tumor entities and healthy brain tissue. This study aims to characterize circARID1As function in neuroblastoma.

Methods: A selection of seven identified circRNAs was validated in a panel of neuroblastoma cell lines using qRT-PCR, Sanger Sequencing and RNase-R treatment. Northern Blot was used for further validation of circARIDA. Expression analysis for all seven circRNA candidates were performed in 11 neuroblastoma cell lines. We investigated cell numbers, cell viability, proliferation, apoptosis and differentiation after knockdown of circARID1A in the neuroblastoma cell lines SH-SY5Y and IMR-5. In the following an overexpression model using the cell line SH-EP was created and a rescue experiment in SH-SY5Y und IMR-5 was performed.

Results: The head-to-tail junctions of all seven circRNA candidates were amplified and sequenced successfully. All candidates except for circTet2 were significantly more resistant to RNase-R compared to their mRNAs. Within the cell lines we found for most of the circRNAs no correlation in their expression with their host gene's expression. Knockdown of circARID1A in IMR-5 resulted in a reduction of cell numbers, cell viability and proliferation and led to differentiation in SH-SY5Y cells. Neither knockdown, nor overexpression of circARID1A influenced ARID1A mRNA levels or protein levels. Overexpression of circARID1A showed no measurable impact on SH-EP cells. The effect seen after knockdown, could not be reversed by the rescue experiment.

Discussion: Data generated by sequencing were validated successfully. Expression analysis suggests an independent regulation of circRNA and mRNA biogenesis. We identified circARID1A as a neuroblasoma specific circRNA. Knockdown experiments indicated an oncogenic role of circARID1A in neuroblastoma, which seemed to be independent of ARID1A mRNA and protein expression. In summary, this study shows the importance of circRNAs in neuroblastoma using the

example of circARID1A. This may help to elucidate the role of non-coding RNAs in neuroblastoma biology and to establish circRNAs as new therapeutic targets and biomarkers.

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom ist ein heterogener Tumor des Kindesalters

Das Neuroblastom ist mit einer Inzidenz von 1,3 Neudiagnosen pro 100.000 im Jahr der häufigste extrakranielle Tumor im Kindesalter (1). Dies entspricht 6-10% aller pädiatrischen Neoplasien. Mit einem medianen Erkrankungsalter von 14 Monaten sind vor allem Säuglinge und Kleinkinder betroffen. Die Inzidenz sinkt mit steigendem Lebensalter und so kommt das Neuroblastom selten beim Erwachsenen vor.

Das Neuroblastom ist ein neuroektodermaler Tumor, der nach heutigem Wissensstand aus Zellen der Neuralleiste hervorgeht (2). Diese migrieren in der frühen embryonalen Entwicklung in die Peripherie und bilden unter anderem das sympathische Nervensystem mit den Grenzstrangganglien sowie die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (3). Dementsprechend variabel sind die Manifestationsorte des Primärtumors. Etwa 65% der Tumoren treten abdominal auf, wobei Tumoren in der Nebennierenrinde häufiger sind als jene im Bereich der paravertebralen Grenzstrangganglien (4). Zum Diagnosezeitpunkt liegen bereits bei etwa 50% der Kinder Lymphknoten- oder Fernmetastasen vor, was eine Hochrisikokonstellation darstellt. Diese treten vor allem im Knochenmark, den Knochen und der Leber auf. Ebenso heterogen wie die Lokalisation ist das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung. Während Kinder mit lokalem Befund häufig asymptomatisch sind und Tumoren nur zufällig durch Vorsorgeuntersuchungen aufgedeckt werden, zeigen Kinder mit disseminierter Krankheit meist Beschwerden wie Fieber und Schmerzen. Bei Metastasierung in die Orbita kann es zu dem klassischen Brillenhämatom kommen, bei Lokalisation in der Halsregion zum Horner Syndrom und bei Kompression des Rückenmarks durch sogenannte Sanduhrumoren zu neurologischen Ausfällen (5). Auch paraneoplastische Syndrome wie das Opsomyoklonus-Ataxie-Syndrom (OMAS) sind beschrieben (6). Hierbei kommt es, vermutlich autoimmun vermittelt, zu unkontrollierten Augenbewegungen, Muskelzuckungen und zerebellärer Ataxie.

Über die Ätiologie des Neuroblastoms ist wenig bekannt. Im Allgemeinen handelt es sich um eine sporadische Erkrankung. Nur in 1% der Fälle treten familiäre Formen auf (7). Das erste Gen, das mit dem Auftreten von familiären Neuroblastomen in Verbindung gebracht wurde, ist *paired-like homeobox 2b (PHOX2B)* (8, 9). Dieses tritt in ca. 7% der familiären Neuroblastome auf. Als Transkriptionsfaktor ist es an der Zellzykluskontrolle und der neuralen Differenzierung beteiligt.

Häufiger, nämlich in der Hälfte der Fälle, kommt es zu einer aktivierenden Keimbahnmutation des *anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (ALK)* Onkogens (10, 11). ALK ist eine Rezeptortyrosinkinase, die an der frühen Neuralentwicklung beteiligt ist. Bei konstitutiver Aktivierung wird ALK zu einem Onkogen. Mutationen des *ALK* Gens treten auch in 5-15 % der sporadischen Neuroblastome auf.

M. Schwab beschrieb 1983 erstmals eine Amplifikation des *N-myc Proto-oncogenes (MYCN)* Onkogens in verschiedenen Neuroblastom Zelllinien (12). Die Amplifikation entsteht durch eine Translokation des kurzen Armes von Chromosom 2 (2p24) und tritt in ca. 20% aller Primärtumoren auf. Sie ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Heute gilt eine *MYCN* Amplifikation als einer der wichtigsten negativen prognostischen Faktoren (13, 14). Neuere Untersuchungen zeigten eine erhöhte Telomerstabilität in Hochrisikoneuroblastomen (15). Diese resultiert bei 13 % der Primärtumoren aus einer Translokation des *telomerase reverse transcriptase (TERT)* Gens. Dies führt zu einer starken Induktion des Enzyms Telomerase. In 5% der Primärtumoren resultiert die hohe Telomerstabilität aus einer inaktivierenden Mutation des *α-thalassaemia/mental retardation syndrome X-linked (ATRX)* Gens. Dies führt zu der Aktivierung sogenannter *Alternative Lengthening of Telomeres (ALT)* Signalwege. Veränderungen der Gene *MYCN*, *TERT* und *ATRX* treten nicht gemeinsam auf. Insgesamt zeichnet sich das Neuroblastom durch eine hohe chromosomale Instabilität aus. Als weiterer negativer prognostischer Faktor gelten 11q Aberrationen. Deletionen auf dem Chromosomen 11 treten in 35-40% neu-diagnostizierter Neuroblastome auf (16). Neuroblastome weisen häufig einen Zugewinn ganzer Chromosomensätze auf. Dies ist bei Patienten unter 18 Monaten mit einer guten Prognose und spontaner Regression assoziiert, während ein diploider Chromosomensatz mit rein segmentalen Chromosomenveränderungen einer schlechteren Prognose einhergeht (17). Ein diploider Chromosomensatz tritt in 37% der Primärtumoren auf. Die genannten genetischen Veränderungen und weitere klinische Merkmale werden bei der Risikoklassifizierung und Therapieentscheidung berücksichtigt.

Das Neuroblastom kann in mehrere Stadien unterteilt werden. Nach der INSS Klassifikation (International Neuroblastoma Staging System) können vier verschiedene Stadien unterschieden werden, wobei sich diese vor allem nach der Ausbreitung des Tumors nach initialer chirurgischer Resektion richten (18). Stadien 1-3 stellen dabei lokale Tumorstadien dar, während es sich bei dem Stadium 4 um metastasierte Tumoren handelt. Das Stadium 4S nimmt eine Sonderrolle ein, indem es Säuglinge unter 12 Monaten inkludiert, die bereits unter Metastasen in Haut, Knochenmark oder

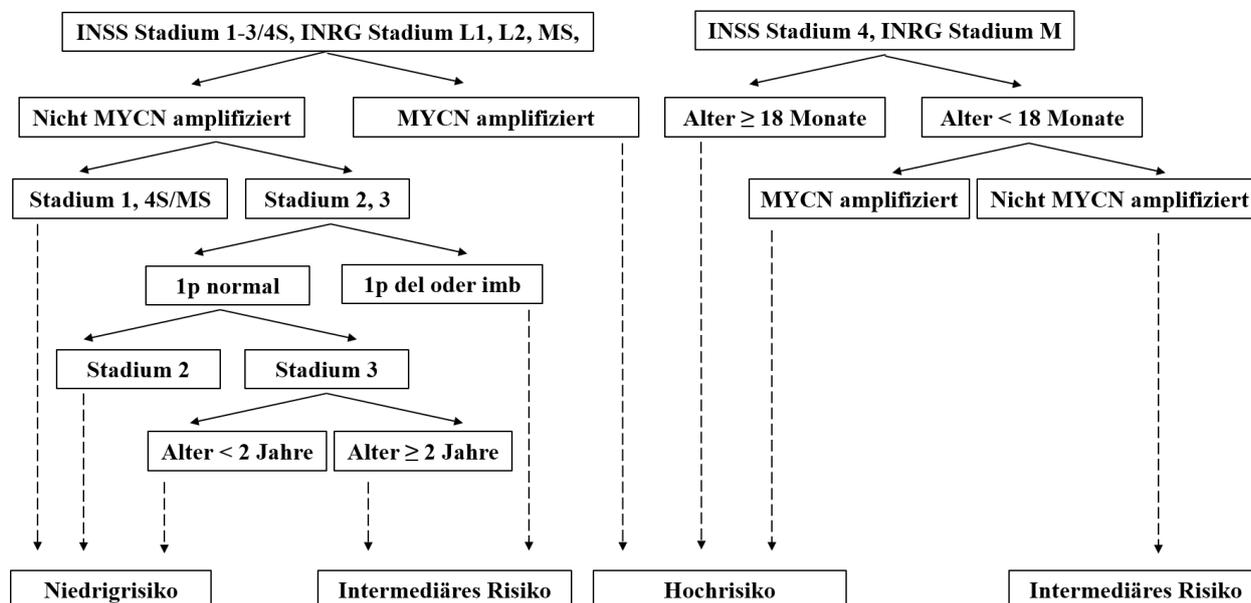
Leber leiden. Grund für diese Sonderstellung ist die gute Prognose, die mit einem 4S Stadium einher geht. Es wurde gezeigt, dass diese Tumoren in spontane Regression gehen können, was entscheidend für die Therapiewahl ist. Die neueren INRG Stadien (International Neuroblastoma Risk Group) richten sich nach prätherapeutischen radiologischen Informationen, die durch MRT, CT, Sonografie und MIBG Szintigrafie gewonnen werden (19). Es wird zwischen den Stadien L1 und L2 als lokalisierte Erkrankung, dem Stadium M als metastasierter Erkrankung und dem Stadium MS, welches Kinder unter 18 Monaten mit limitiertem Metastasierungsmuster einschließt, unterschieden. Beide Klassifikationen werden in Rahmen von Studien erhoben und für klinische Entscheidungen verwendet. Die INRG Klassifikation berücksichtigt neben den INRG Stadien auch molekulare Merkmale für die Einteilung in Risikogruppen. Insgesamt werden das Patientenalter, die Histologie, der *MYCN* Status, 11q Abberationen und Diploidie berücksichtigt. Auf diesen Weg können vier Risikogruppen unterschieden werden, um das prätherapeutische Risiko einzuschätzen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Risikogruppen nach INRG Klassifikation (nach Cohn *et al.*, 2009). Für die Risikoklassifikation nach der INRG werden neben den Tumorstadien auch molekulare Merkmale des Tumors berücksichtigt. Das Überleben der Patienten ist stark von der jeweiligen Risikoklasse abhängig.

Prätherapeutisches Risiko	5-Jahres ereignisfreies Überleben	Anteil der Patienten [%]
Sehr niedriges Risiko	> 85 %	28,2
Niedriges Risiko	75 bis ≤ 85%	26,8
Mittleres Risiko	50 bis ≤ 75%	9,0
Hohes Risiko	< 50%	36,1

Die heterogenen Prognosen der Patienten erfordern ein differenziertes Therapieregime. Die Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) teilt die Patienten in der deutschen NB2004 Studie daher in drei Gruppen ein (siehe Grafik 1) (20). In der Niedrigrisiko Beobachtungsgruppe werden Patienten engmaschig untersucht, eine Chemotherapie wird nur bei tumorassoziierten Symptomen in Erwägung gezogen. In der mittleren Risikogruppe kommt eine Chemotherapie und die chirurgische Resektion zum Einsatz. Eine zusätzliche Radiotherapie kann in Erwägung gezogen werden. In der Hochrisikogruppe, die unter anderem alle Patienten mit *MYCN* Amplifikation inkludiert, erhalten die Patienten eine aggressive Induktionschemotherapie, chirurgische Resektion, Strahlentherapie und autologe Stammzelltransplantation. Trotz dieser aggressiven Vorgehensweise in der Hochrisikogruppe liegt das 5-Jahres Überleben dieser Kinder bei unter 50%. Eine besonders große Herausforderung stellt der Umgang mit Rezidivsituationen dar, die weiterhin mit einer sehr hohen Sterblichkeit einhergehen und schlecht auf Therapien

ansprechen. Ein besseres Verständnis dieser Tumorentität ist daher unerlässlich, um in der Zukunft neue Biomarker und therapeutische Ziele definieren zu können und die Prognose von erkrankten Kindern und Jugendlichen zu verbessern.



Grafik 1: Risikostratifizierung nach dem NB 2004 Protokoll (nach Simon *et al.*, 2017). Die Gruppeneinteilung nach NB 2004 Protokoll dient als Grundlage für Therapieentscheidungen. Es werden sowohl Erkrankungsstadium, Alter des Patienten und molekulare Eigenschaften berücksichtigt.

1.2 Nichtkodierende RNAs bilden ein komplexes regulatorisches Netzwerk

Verglichen mit adulten Tumoren weist das Neuroblastom sehr wenige Mutationen in proteinkodierenden Genen auf. Daher hat man sich in den letzten Jahren vermehrt mit nichtkodierenden RNAs (ncRNAs) beschäftigt. Unter die ncRNAs fallen unter anderem die *micro* RNAs (miRNAs) und die *long-non-coding* RNAs (lncRNAs). Nichtkodierende RNAs machen etwa 60% des humanen Transkriptoms aus (21). Ihre Funktionen lassen sich schlecht isoliert betrachten, sondern bilden vielmehr ein komplexes ncRNA-Netzwerk.

Micro RNAs sind kleine 20-23 Nukleotide lange, hoch konservierte RNAs (22). Durch Bindung des 3'-untranslatierten Bereichs (3'-UTR) von mRNAs können sie die Expression und Translation dieser inhibieren. Hierfür ist vor allem die Komplementarität der Nukleotide 2-8 der reifen miRNA zu der 3'-UTR der mRNA relevant. MiRNAs können wiederum von anderen ncRNAs wie den lncRNAs gebunden und reguliert werden. Im Neuroblastom wurden miRNAs, die im engen Zusammenhang mit dem *MYCN* Onkogen stehen, identifiziert. So wird das *MYCN* Onkogen direkt

durch miR-34a reguliert, wodurch Apoptose in Neuroblastom Zellen induziert und Proliferation gehemmt wird (23). Auf der anderen Seite gibt es auch miRNAs die durch *MYCN* selbst reguliert werden. Das miR-17-92-Cluster beispielsweise korreliert positiv mit der Expression von *MYCN* und wird durch dieses reguliert. Es hemmt die Differenzierung von Neuroblastom Zellen und fördert das Tumorwachstum (24, 25).

Unter den lncRNAs im Neuroblastom sind sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Moleküle beschrieben. So wurde 2014 erstmals über die lncRNA *NBAT1* (*Neuroblastoma Associated Transcript 1*) im Neuroblastom berichtet, welche positiv mit ereignisfreiem Überleben korreliert und somit einen potenziellen Biomarker darstellt (26). *NBAT1* agiert durch Chromatinregulation als Tumorsuppressor und inhibierte Proliferation und Invasion in Neuroblastom Zelllinien und *in-vivo* Modellen. *NBAT1* ist Teil des Neuroblastom-assoziierten 6p22q Locus und in Hochrisikoneuroblastomen herunterreguliert (27). Gemeinsam mit anderen lncRNAs dieses Locus (6p22lncRNAs) stabilisiert *NBAT1* den Transkriptionsfaktor *SOX9* (*SRY-Box Transcription Factor 9*), welcher die Differenzierung von neuronalen Zellen fördert. Unter den onkogenen lncRNAs im Neuroblastom ist die lncRNA lncNB1, die über die Bindung an ribosomale Proteine die Expression von Proteinen fördert, welche an der Stabilisierung des *MYCN* Proteins beteiligt sind (28).

All diese Entdeckungen tragen zu der Entschlüsselung eines komplexen Netzwerkes von kodierenden und nicht-kodierenden RNAs, sowie von Proteinen im Neuroblastom bei, zeigen auf der anderen Seite aber auch auf wie wenig wir wirklich über die Pathogenese und Biologie des Tumors wissen.

1.3 Zirkuläre RNAs sind eine neue Klasse von ncRNAs

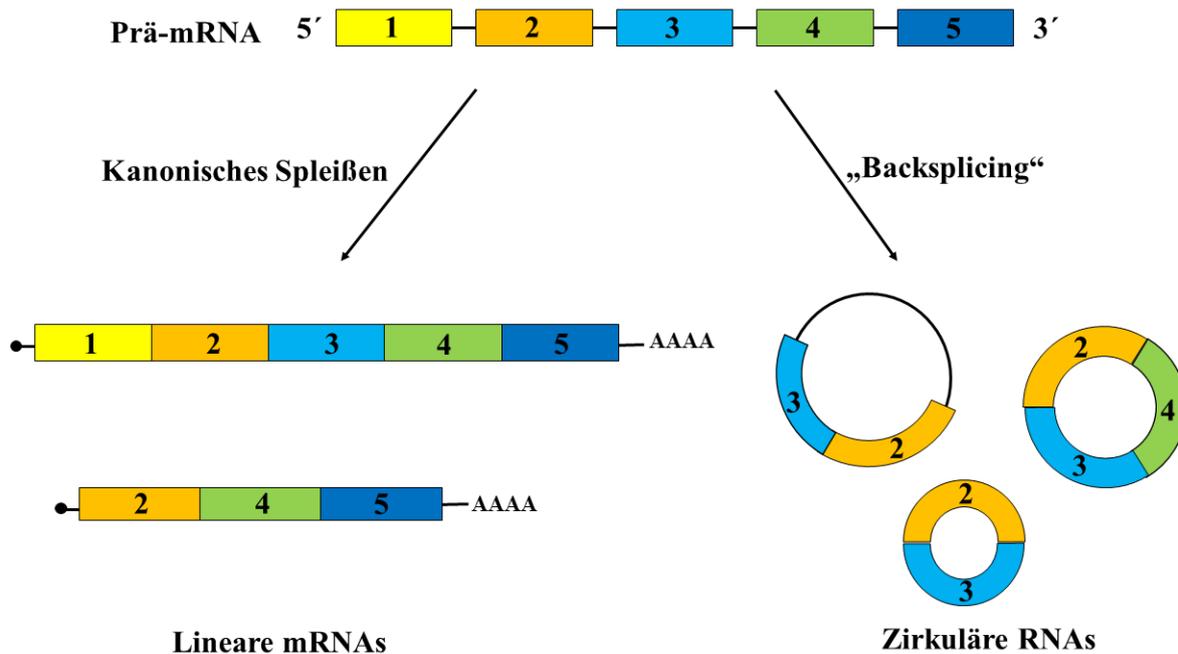
Neben den lncRNAs und den miRNAs gehören auch die zirkulären RNAs (circRNAs) zu der Klasse der nicht-kodierenden RNAs. Zirkuläre RNA-Moleküle wurden erstmals 1979 durch Elektronenmikroskopie in HeLa-Zellen entdeckt (29). In den folgenden Jahrzehnten wurden immer wieder zirkuläre RNAs beobachtet, jedoch hielt man diese lediglich für ein Nebenprodukt kanonischen Spleißens (30). 2012 änderte eine Studie von Julia Salzman *et al.* diese Ansicht. Durch *Next Generation Sequenzierung* von humanen und murinen Zellen konnten ubiquitär exprimierte circRNAs identifiziert werden (31). Es folgten Studien, die zeigen, dass circRNAs

über den gesamten eukaryotischen Stammbaum exprimiert werden und hoch konserviert sind (32). Mittlerweile weiß man, dass circRNAs Teil eines komplexen Netzwerkes kodierender und nicht-kodierender RNAs und Proteine sind. Sie sind in elementare physiologische wie auch pathologische Prozesse involviert (33). Die AG Rajewsky vom *Berlin Institute for Molecular Medicine* (BIMSB) hat 2014 die circRNA Datenbank circBASE erstellt, um eine einheitliche Nomenklatur zu etablieren und eine Plattform für Forscher in dem Feld zu errichten (34).

Zirkuläre RNAs sind kovalent geschlossene, einsträngige RNA Moleküle. Die meisten circRNAs werden von Genen kodiert, die auch für mRNAs (*messenger RNA*) kodieren (35). Sie enthalten in der Regel 2-3 Exons, aber auch circRNAs, die nur aus Introns oder aus Introns und Exons bestehen, sind beschrieben. Als zirkuläre Moleküle besitzen circRNAs keine freien Enden, keinen Poly(A)-Schwanz und keine 5'-Cap-Struktur. Dies macht sie besonders stabil gegenüber Exonukleasen wie der RNase-R. Ihre enorme Stabilität äußert sich auch in einer hohen Halbwertszeit von >48h (36). Die Halbwertszeit von mRNAs liegt im Vergleich bei <20h. Durch ihre hohe Stabilität werden circRNAs als potenzielle Biomarker diskutiert. Ihre Nachweisbarkeit im Blut unterstützt dies zusätzlich (37). Selbst extrazellulär innerhalb von Exosomen konnten circRNAs nachgewiesen werden (38).

Die Expression zirkulärer RNAs ist gewebespezifisch und korreliert kaum oder gar nicht mit der Expression der jeweiligen mRNA desselben Gens (39, 40). Das deutet darauf hin, dass das Spleißen von circRNAs unabhängig von dem der mRNA erfolgen muss. Diese alternative Form des Spleißens wird „Backsplicing“ genannt. Exons, aus denen circRNAs gespleißt werden, werden auffallend häufig von langen Introns flankiert (41). Diese enthalten komplementäre ALU-Sequenzen oder andere nicht hoch-repetitive komplementäre Sequenzen. Durch das Dimerisieren dieser Abschnitte werden die Donor- und Akzeptor-Sequenzen in räumliche Nähe gebracht und die Bildung einer zirkulären RNA gefördert. Diese *cis*-Elemente allein erklären jedoch nicht das differenzielle Spleißen von circRNAs. Hinzu kommen *trans*-regulatorische-Elemente wie die Bindung von RNA Bindeproteinen (RBPs) in den flankierenden Introns. Das RBP *Quaking* (QKI) beispielsweise bindet in flankierenden Introns vieler Exons, die circRNAs bilden (42). Durch Dimerisierung werden die Donor- und Akzeptor-Sequenzen in räumliche Nähe gebracht und die Bildung von circRNAs unterstützt. *Quaking* wird als mesenchymaler Spleißfaktor während der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) differenziell exprimiert. Dadurch wird die Expression von circRNAs während der EMT induziert. Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Bildung von circRNAs hat, ist das Enzym ADAR1 (*Adenosine Deaminase Acting on RNA 1*) (43).

Das RNA-Edierungs-Protein tauscht innerhalb von ALU-Sequenzen in flankierenden Introns Adenosin gegen Inosin, wodurch das Spleißen von circRNAs gehemmt wird. ADAR1 korreliert negativ mit der Expression von circRNAs während der neuronalen Differenzierung (44). Das finale Spleißen von circRNAs erfolgt wie beim kanonischen Spleißen durch das Spleißosom. Lineare RNAs und circRNAs konkurrieren somit um das Spleißen (45).



Grafik 2: Zirkuläre RNAs werden durch sogenanntes „Backsplicing“ generiert. Nach Huang *et al.*, 2017 (46). Das kanonische Spleißen umfasst neben dem Herausschneiden von Introns und Exons auch Prozesse wie das „Capping“ und die Polyadenylierung. Dies findet während des „Backsplicings“ nicht statt. Sowohl mRNAs als auch circRNAs werden durch das Spleißosom generiert.

Für den Großteil aller circRNAs ist die Funktion und der Wirkmechanismus unbekannt. Nur für einige wenige Kandidaten konnten bis heute Funktionen beschrieben werden. Eine der best-validierten circRNAs ist CDR1as (*CDR1 antisense*), auch bekannt unter dem Namen ciRS-7 (*circular RNA sponge for miR-7*). Sie entsteht aus der lncRNA LINC00632, welche von dem reversen Strang des *CDR1*-Gens (*Cerebellar Degeneration-Related protein 1*) transkribiert wird (47). CDR1as besitzt mehr als 70 Bindestellen für die miRNA miR-7. Hierdurch wirkt CDR1as als *miRNA-Sponge*, was bedeutet, dass sie die miRNA bindet und sie dadurch von ihrer Funktion, der Inhibition ausgewählter mRNAs, hindert (48). CDR1as selbst wird nicht von miRNA-7 abgebaut, da keine der Bindestellen die dafür benötigte perfekte Homologie besitzt. Interessanterweise besitzt CDR1as jedoch eine perfekt homologe Sequenz zu der miR-671. Bindet miR-671 CDR1as so wird diese durch den RISC Komplex (*RNA-induced silencing complex*)

abgebaut (49). Neben CDR1as gibt es nur einige wenige circRNAs, welche eine so hohe Zahl an Bindestellen für ein und dieselbe miRNA besitzen (50). Dies lässt vermuten, dass die Funktion als *miRNA-Sponge* nur auf wenige circRNAs zutrifft. Für andere circRNAs wurde die Bindung von RBPs beschrieben. So können circRNAs als *RBP-Sponges* agieren, Proteinaktivität fördern, Proteinkomplexe verbinden oder auch Proteine transportieren (33). Eine besonders interessante Wechselwirkung zwischen den Transkripten eines Gens ist für *muscleblind (MBL)* beschrieben (45). Das *MBL*-Gen kodiert für den Spleißfaktor Muscleblind der für die Bildung der zirkulären RNA circMBL desselben Gens notwendig ist. CircMBL wiederum inhibiert Muscleblind durch Bindung. Dadurch entsteht eine komplexe Feedback-Regulation. Eine weitere circRNA, die ein RBP bindet ist die aus einem Intron bestehende circAGO2 (51). Durch Bindung an HuR (*human antigen R*) wird dessen Anreicherung in der 3'-UTR der Ziel-mRNAs erleichtert. Dies bewirkt eine verminderte Bindung von AGO2 (Argonaute-2) in dieser Region und einen verminderten Abbau der mRNA durch den RISC Komplex. Obwohl circRNAs der Klasse der nicht-kodierenden RNAs zugeordnet werden, wurde vereinzelt von Translation dieser Moleküle berichtet. Zwar besitzen circRNAs keine 5'Cap-Struktur, können jedoch ähnlich wie auch Viren *internal ribosome entry sites (IRES)* nutzen, um an Ribosomen zu binden und die Translation des *Open reading frames (ORF)* zu initiieren (52). Dies konnte bis jetzt nur für einige wenige endogene circRNAs gezeigt werden. Eine diese circRNAs wird von dem *SNF2 histone linker PHD RING helicase (SHPRH)* Gen transkribiert (53). Diese circRNA nutzt zwar dasselbe Startcodon wie die vom selben Gen generierte mRNA, bildet durch ihre Ringschlussverbindung jedoch ein neues Stopcodon. Das hierdurch entstehende 17kDa große Protein ist im Glioblastom herunterreguliert und konnte durch Überexpression das Tumorstadium *in vitro* und *in vivo* hemmen. Während sich die meisten aus Exons bestehenden circRNAs im Zytoplasma befinden (31), wurden circRNAs, die aus Exons und Introns bestehen (EiRNAs), im Nukleus nachgewiesen. EiRNAs binden die small nuclear RNA (snRNA) U1 (54). Diese ist Teil den Polymerase II Transkription Komplexes. Durch die Bindung der EiRNAs an U1 wird die Expression ihrer jeweiligen Wirtsgene gefördert. Während für einige wenige circRNAs Wirkungsweisen beschrieben sind, bleibt es Aufgabe der Forschung weitere Mechanismen zu entschlüsseln und somit die Rolle von circRNAs zu definieren.

Zirkuläre RNAs werden besonders hoch in neuralen Geweben exprimiert. Ihre größte Abundanz zeigen sie während der neuralen Differenzierung (44, 55). Dies konnte in verschiedenen Experimenten mit humanen und murinen Zelllinien, sowie mit primären murinen Neuronen nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Zellen für mehrere Tage mit Retinsäure behandelt, was

die Zellen zur Differenzierung anregt. Interessanterweise scheint die hohe Expression von circRNAs in differenzierten Neuronen kein reiner Akkumulationseffekt durch die niedrige Proliferation zu sein. In reifen Neuronen wurden circRNAs nicht nur intrazellulär, sondern auch im synaptischen Spalt nachgewiesen. Dies könnte auf eine Rolle von circRNAs in neuronalen Signalwegen hinweisen.

Die Beteiligung zirkulärer RNAs in epigenetische Regulation und ihre differenzielle Expression in verschiedenen Geweben, haben unter Forschern die Hypothese geweckt, dass circRNAs an der Pathologie von Neoplasien beteiligt sind. In zahlreichen Tumorentitäten konnten bereits tumorsuppressive und onkogene circRNAs beschrieben werden (56). Du *et al.* zeigten 2017, dass circFoxo3 in zahlreichen Tumorzelllinien nur niedrig exprimiert wird (57). Überexpression von circFoxo3 induzierte zu Apoptose und inhibierte das Tumorwachstum *in vitro* und im Xenograft Modell von Mammakarzinom Zellen. Durch Bindung und Stabilisierung von FOXO3 (*Forkhead box O3*) durch circFOXO3 steigt die Expression des proapoptotischen Proteins PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*). Im Gegensatz zu circFOXO3 wirkt die 2018 von Zeng *et al.* beschriebene circRNA circHIPK3 als Onkogen (58). Sie ist in vielen kolorektalen Karzinomen c-MYC abhängig hochreguliert und scheint über die Bindung von miR-7 die tumorsuppressive Wirkung dieser zu inhibieren. Die Entdeckungen dieser und weiterer in Neoplasien beschriebener circRNAs wecken Hoffnung auf neue Biomarker und Therapien.

1.4 Zirkuläre RNAs im Neuroblastom

Bis dato ist sehr wenig über die Rolle zirkulärer RNAs im Neuroblastom bekannt. Die besondere Rolle von circRNAs in der neuronalen Differenzierung und der Pathologie von zahlreichen Neoplasien, lassen jedoch eine Rolle in der Pathogenese des Neuroblastoms vermuten.

Rybak-Wolf *et al.* untersuchten 2015 die Expression zirkulärer RNAs während der neuronalen Differenzierung (44). Interessanterweise nutzen sie als humanes Neuroblasten-Modell die Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y. Sie behandelten die Zellen mit Retinsäure, um diese zu differenzieren. Durch Total RNA-Sequenzierung konnten zahlreiche differenziell exprimierte RNAs identifiziert werden. Eine globale Induktion der circRNA Expression, wie sie sie für die Differenzierung von murinen Neuralzellen beschrieben, blieb jedoch aus. Dies begründeten Rybak-Wolf *et al.* mit einer bereits hohen Basalexpression in den SH-SY5Y Zellen. Insgesamt wurden

4264 circRNAs identifiziert. Nach 4 Tagen Behandlung mit Retinäure zeigten sich 539 circRNAs signifikant herunter- und 494 circRNAs hochreguliert. Basierend auf diesem Datensatz beschrieben Suenkel *et al.* 2020 die circRNA circSLC45A4 (*Solute Carrier Family 45 Member 4*). Die Expression von circSLC45A4 sinkt während der Differenzierung. Knockdown von circSLC45A4 in SH-SY5Y Zellen ließ diese spontan differenzieren.

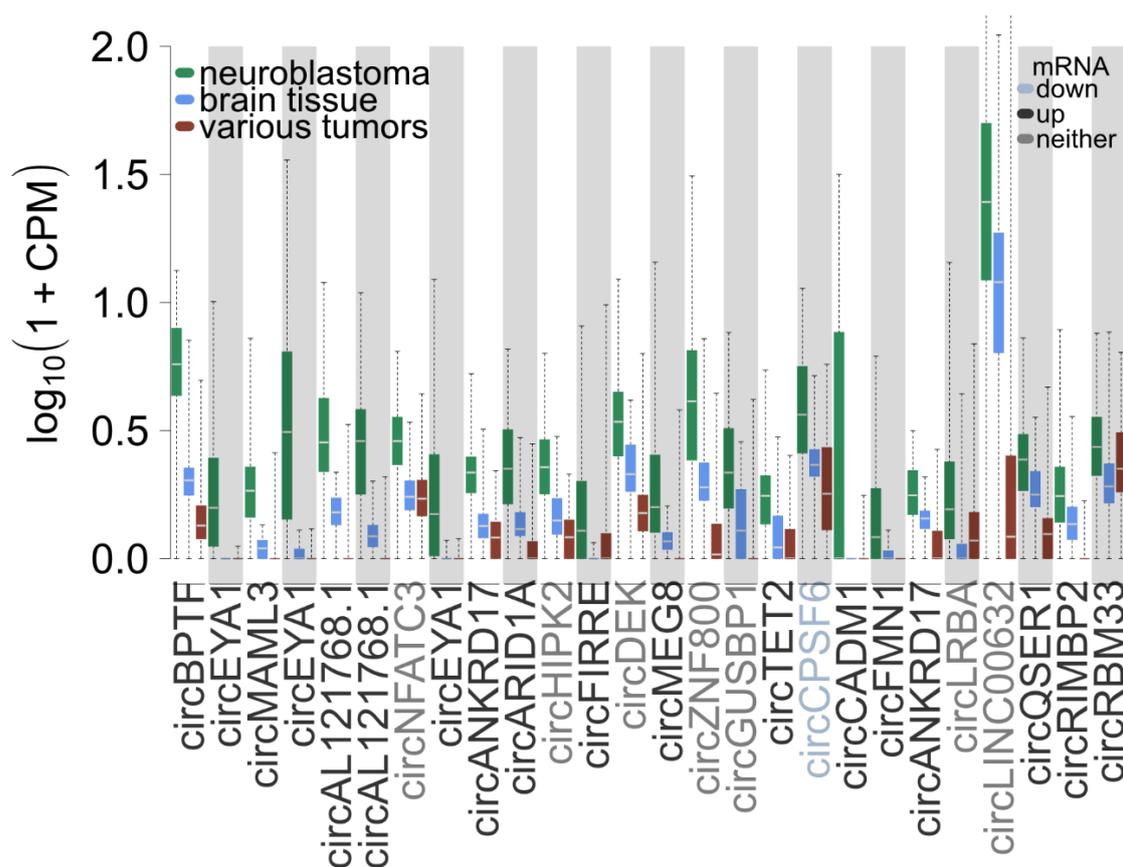
Chen *et al.* beschrieben 2018 die aus einem Intron bestehende circAGO2 (51). Sie identifizierten diese durch gezielte Suche auf circBASE nach circRNAs die von dem *Argonaute 2 (AGO2)* Gen transkribiert werden. Analysen durch quantitative Real Time PCR zeigten eine höhere Expression von circAGO2 in 32 Neuroblastomen verglichen mit 8 besser differenzierten Ganglioneuroblastomen. Weitere funktionelle Analysen erfolgten jedoch in Zellen von Magenkarzinomen. Hier zeigten sich tumorfördernde Eigenschaften (siehe 1.3).

2019 untersuchten Li *et al.* die aerobe Glykolyse im Neuroblastom (59). Sie identifizierten durch Mikroarray Daten den Transkriptionsfaktor *CUT-like homeobox 1 (CUX1)*, welcher mit einer schlechten Prognose korrelierte. Im Laufe der Studie entdeckte man, dass *CUX1* auch eine zirkuläre Isoform -circCUX1- bildet. Die Expression der linearen und zirkulären Isoformen korrelierten positiv. Insgesamt gelang es ein komplexes Netzwerk zwischen circCUX1 und seinen Interaktionspartnern zu identifizieren. So fördert circCUX nicht nur die Expression von *CUX1* selbst, sondern bindet auch *EWS RNA-binding protein 1 (EWSR1)* und fördert dessen Interaktion mit *MYC-associated zinc finger protein (MAZ)*, was in der Transkription tumorfördernder Faktoren resultiert. Li *et al.* postulieren die circ-CUX1/EWSR1/MAZ-Achse als ein neues potenziell therapierbares Ziel im Neuroblastom.

In den Folgejahren wurden zudem circDGKB (60), circKIF2A (61) und circPDE5A (62) als tumorfördernde circRNAs im Neuroblastom identifiziert.

Zusammenfassend geben diese Daten Hinweise auf einen Einfluss zirkulärer RNAs in der Pathogenese des Neuroblastoms. Eine systematische Analyse zirkulärer RNAs im Neuroblastom erfordert jedoch eine unvoreingenommene Analyse primärer Tumoren durch Total RNA Sequenzierung. Die AG Schulte (Charité, Berlin) hat daher 104 primäre Neuroblastom Proben analysiert. Die *Total RNA Next Generation* Sequenzierung erfolgte auf einem HiSeq4000 (Illumina, San Diego, USA) mit einer Lesebreite von 2x150 Nukleotiden. In den bis jetzt unveröffentlichten Daten wurden insgesamt 5171 verschiedene circRNAs von 2290 Genen identifiziert. Unter den Tumorproben befanden sich nach NB2004 Einteilung (siehe Grafik 1) und INSS-Klassifikation 52 Hochrisikoneuroblastome, davon 28 mit *MYCN*-Amplifikation, 10 mit

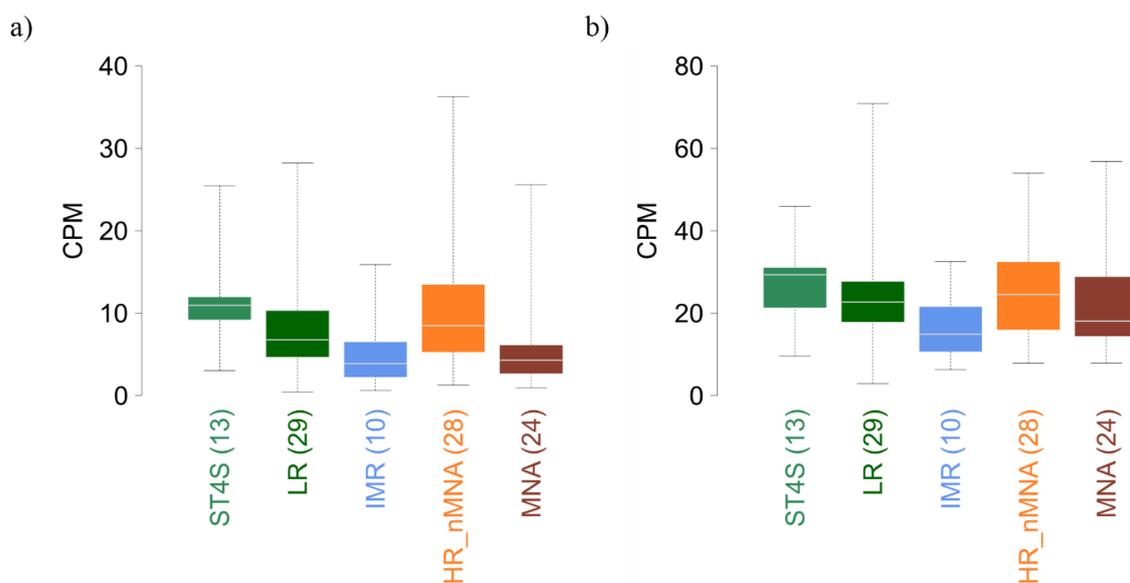
intermediärem Risiko und 42 Niedrigrisikoneuroblastome, davon 13 im Stadium 4S. Zwischen den Risikogruppen zeigte sich keine signifikante Differenz in der Gesamtabundanz der circRNAs. Um Neuroblastom-spezifische circRNAs zu identifizieren, wurde die Expression der circRNAs in der Neuroblastom-Kohorte mit publizierten Datensätzen von gesunden neuralen Geweben und verschiedenen Tumorentitäten verglichen. Es zeigten sich 26 circRNA-Kandidaten, die signifikant höher im Neuroblastom exprimiert wurden (P-Wert < 0,001 im einseitigen Mann-Whitney Test).



Grafik 3: Neuroblastom spezifische circRNAs. Die AG Schulte identifizierte 26 Neuroblastom spezifische circRNAs („*neuroblastoma*“). Diese waren im Vergleich zu neuralen Geweben („*brain tissue*“) und anderen Tumorentitäten („*various tumors*“) hochreguliert. Bei 18 dieser Kandidaten war die zugehörige mRNA ebenfalls hochreguliert („*up*“), in 7 Fällen unverändert („*neither*“) und in einem Fall herunterreguliert („*down*“).

Unter den Neuroblastom spezifischen circRNAs befand sich eine zirkuläre Isoform des *ARID1A* (*AT-Rich Interaction Domain 1A*) Gens, welches im Neuroblastom und in anderen Tumorentitäten als Tumorsuppressor beschrieben ist. ARID1A ist Teil des *SWItch/Sucrose Non-Fermentable* (SWI/SNF) Komplexes, der an der neuralen Differenzierung beteiligt ist (63, 64). Der SWI/SNF Komplex ist eine katalytische ATP-abhängige Einheit, die an der Modifikation von Chromatin

beteiligt ist. Die Untereinheiten dieses Komplexes sind in über 20% aller Neoplasien mutiert (65). Auch das zuvor beschriebene *ATRX* Gen kodiert für eine seiner Untereinheiten. Laut einer Studie von Sausen *et al.* aus dem Jahr 2013 treten *ARID1A* Mutationen in 6% und *ARID1B* (*AT-Rich Interaction Domain 1B*) Mutationen in 7% der untersuchten Neuroblastome auf (66). Neuere Studien von 2020 identifizieren *ARID1A* als Tumorsuppressor des 1p36 Lokus (67). 70% aller *MYCN* amplifizierten Neuroblastome sind mit einer Deletion dessen assoziiert. Lange Deletionen, die das *ARID1A* Gen enthalten, unterstützen die *MYCN* getriebene Onkogenese. Bui *et al.* suggerieren 2019, dass *ARID1A* als Teil des SWI/SNF Komplexes den transkriptionellen Suppressor *SIN3 transcription regulator family member A* (*SIN3A*) zu dem *TERT* Promotor rekrutiert (68). Hierdurch wird die Expression von *TERT* gehemmt. Die Expression von *ARID1A* und *TERT* korreliert invers während der Differenzierung von Neuroblastomzellen durch Retinsäure Behandlung.



Grafik 4: Expression von circARID1A (a) und *ARID1A* mRNA (b) im Neuroblastom. Dargestellt sind die *counts per million* (CPM) in den unterschiedlichen Risikoklassen (NB 2004) der durch die AG Schulte sequenzierten Tumoren. ST4S = Stadium 4S; LR = Niedrigrisiko; IMR = Intermediäres Risiko; HR_nMNA = Hochrisiko, nicht *MYCN* amplifiziert; MNA = Hochrisiko, *MYCN* amplifiziert. Die Expressionslevel lassen keinen Schluss auf die biologische Funktion von circARID1A zu.

Dass das *ARID1A* Gen nicht nur für eine lineare mRNA, sondern auch für eine zirkuläre Isoform kodieren zu scheint, ist hochinteressant. Man bedenke, dass zwar schon für einige cirRNAs Interaktionen mit ihren zugehörigen mRNAs gezeigt wurden, sie jedoch auch völlig unabhängig von ihrem Wirtsgen agieren können. Die Rolle von circARID1A ist somit unbekannt. Die Expressionslevel in den verschiedenen Risikogruppen konnte keinen Hinweis auf tumorfördernde

oder tumorsuppressive Funktionen geben. Im Gegensatz zu der Mehrheit der anderen circRNAs korreliert die Expression von circARID1A mit der der *ARID1A* mRNA ($R^2 = 0,608$; $P < 2e-16$).

1.5 Fragestellung

Das Neuroblastom ist ein sehr heterogener Tumor. Während Niedrigrisikotumoren sich spontan zurückbilden oder differenzieren können, benötigen Hochrisikotumoren eine aggressive Therapie mit Polychemotherapie, Radiatio und Knochenmarktransplantation. Leider befinden sich 50% der Kinder zu Diagnosezeitpunkt in einer Hochrisikokonstellation, die mit einem 5-Jahres Überleben von unter 50% einhergeht. Als pädiatrischer Tumor weist das Neuroblastom nur sehr wenige Mutationen in proteinkodierenden Genen auf. Diese Studie wird sich daher mit einer neuen Klasse nichtkodierender RNAs, den zirkulären RNAs, beschäftigen. Aufgrund ihrer hohen Stabilität sind diese als potenzielle Biomarker oder therapierbare Ziele besonders interessant.

Die AG Schulte konnte in 104 primären Neuroblastomen zahlreiche circRNA Kandidaten identifizieren, darunter 26 Neuroblastom-spezifische circRNAs. Ziel dieser Arbeit ist eine Stichprobe von circRNAs zu validieren, um die Sequenzierungsdaten zu bestätigen. Im Weiteren soll die Funktion der zirkuläre Isoform des *ARID1A* Gens in Neuroblastom Zelllinien weiter charakterisiert werden.

Hierdurch soll ein Beitrag zu einem besseren Verständnis der Pathologie des Neuroblastoms und von zirkulären RNAs im Allgemeinen geleistet werden. Dies kann die Basis für weitere Studien zu der Identifizierung neuer Biomarker und therapierbarer Ziele im Neuroblastom sein.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
4200 TapeStation	Agilent
C1000 Touch PCR Cycler	Bio-Rad
DOC-print VX5 Imaging System	Peq-lab
DynaMag™-PCR Magnet	Invitrogen
Epoch Microplate Reader	BioTek
Fusion FX	Vilber
Gelelektrophoresesystem	Peqlab
Gene Pulser Xcell	Bio-Rad
Glomaxx Multi+ Detection System	Promega
HiSeq 4000	Illumina
Hybridisierungsöfen	GFL 7601
IncuCyte®S3 Live Cell System	Essen Biosciences
Inkubator HERAcell 240i	Thermo Scientific
Mini-PROTEAN® -Tetra System	Bio-Rad
Multipette	Eppendorf
NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific™
Pipetten Research plus	Eppendorf
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
PowerPac™ Basic Gel Chamber	Bio-Rad
Rotamax 120 Orbitalschüttler	Heildorph Instruments
StepOnePlus Real-time PCR System	Applied Biosciences
Sterilbank SAFE 2020	Thermo Scientific
Tabletop Centrifuge 5424R	Eppendorf
TC20™ Automated Cell Counters	Bio-Rad
ThermoMixer C	Eppendorf
Trans-Blot Turbo System	Bio-Rad
UV Stratalinker 1800	Stratagene
Wasserbad	GFL

2.1.2 Kits

Kit	Hersteller	Katalog Nummer
BCA Protein Assay	Santa Cruz Biotech	sc-202389
Cell Titer GLO Luminescent Cell Viability Assay	Promega	G7570
Endo free Plasmid Kit	Qiagen	12362
Maxima H MinusFirst Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific	K1652
NucleoBond™ Xtra Maxi-Kits	Macherey-Nagel	12792603
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	28704
TruSeq Stranded mRNA Kits	Illumina	20020594

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Katalog Nummer
100% EtOH (Molecular Grade)	Fisher Bioreagents	184583
100% Methanol	Roth	4627.6
Agarose	Biozym	840004
AMPure XP Beads	Beckman Coulter	A63881
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche	11093274910
Blocking Reagent	Roche	11096176001
CDP- <i>Star</i> ®, ready-to-use	Roche	12041677001
Chloroform	Serva	840004
cis-Butendisäure (Maleic acid)	Sigma-Aldrich	M0375
DIG RNA Labeling Mix	Roche	11277073910
EGTA	Roth	8040.3
Essigsäure	Roth	6755.1
Ethidiumbromidlösung 0,5 %	Roth	HP46.2
Gene Ruler 100 bp DNA-Leiter	Thermo Scientific	SM0241
Gene Ruler 1kb DNA-Leiter	Thermo Scientific	SM0311
Glycine	Roth	3790.1

Glycogen	Thermo Scientific	R0551
HEPES	Roth	X999.1
Isopropanol	Serva	39559.02
Laemmli Buffer	Bio-Rad	1610747
LB-Agar	Roth	X965.2
LB-Medium	Roth	X964.2
Lipofectamine 3000	Invitrogen	L3000015
Low fat milk powder	Roth	T145.2
MOPS	Roth	6979.2
my-Budget dNTP-Mix	Bio-Budget Technologies	80-80010250
NaCl	Roth	3957.2
NorthernMax™ Prehybridization/Hybridization Buffer	Invitrogen	AM8677
NorthernMax™-Gly Sample Loading Dye	Invitrogen	AM8551
NP-40 (10% in H ₂ O)	Biovision	2111
Nuklease freies Wasser	Ambion	AM9937
Precision Plus Protein™ Standard Ladder	Bio-Rad	161-0374
RNA Molecular Weight Marker I, DIG-labeled	Roche	11526529910
SDS	Roth	CN30.3
Sodium Acetate (3 M), pH 5.5, RNase-free	Invitrogen	AM9740
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth	HN12.1
TRIS-HCl, pH 7,5	Roth	9090.3
Triton X-100	Roth	3051.4
TRIzol©	Life Technologies	15596018
Tween 20	Roth	9127.1
Western Blotting Reagents	Santa Cruz Biotech	sc-2048

2.1.4 Puffer und Lösungen

TAE Puffer, pH 8

Tris	2M
------	----

TBST Puffer, pH 7,5

Tris-Base	50mM
-----------	------

Na ₂ EDTA	0,5M
Essigsäure	1M
dH ₂ O	auf 1l

NaCl	150mM
Tween 20	0,1%
dH ₂ O	auf 1l

Protein Lyse Puffer

HEPES	15mM
NaCl	150mM
EGTA	10mM
Triton X-100	2%

NuPAGE MOPS SDS Lauf Puffer (20x)

MOPS	1M
TRIS Base	1M
SDS	2%
EDTA	20mM
dH ₂ O	auf 1l

Transfer Puffer (10x)

Tris-Base	25mM
Glycine	192mM
dH ₂ O	auf 1l

MOPS Puffer (10x), pH 7

MOPS	200mM
Na-Acetat	50mM
EDTA	10mM
ddH ₂ O	auf 1l

10x TBE (Tris-Borate-EDTA-Buffer)

Tris-Base	1M
Borsäure	1M
EDTA	20mM
ddH ₂ O	auf 1l

20x SSC (saline-sodium citrate), pH 7

NaCl	3M
Trinatriumcitrat	30mM
ddH ₂ O	auf 1l

Detektionspuffer, pH 9,5

Tris-Base	0,1M
NaCl	0,1m
ddH ₂ O	auf 0,5l

cis-Butendisäure Puffer, pH 7,5

cis-Butendisäure	0,1M
NaCl	0,15M
ddH ₂ O	auf 1l

2.1.5 Enzyme und zugehörige Puffer

Enzym	Hersteller	Katalog Nummer
AgeI	New England Biolabs	R0552S
Alkalische Phosphatase	Roche	APMB-RO
Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor	Roche	04693159001
CutSmart Puffer (10x)	New England Biolabs	B7204S
FastStart Essential SYBR® Green Master	Roche	06402712001
HindIII	New England Biolabs	R0104S
KAPA2G Fast Hot Start Ready Mix	Kapa Biosystems	KK5601
NEBuffer™ 2.1	New England Biolabs	B7202S
NheI	New England Biolabs	R0131S
PacI	New England Biolabs	R0547S
PhosStop Phosphatase Inhibitor	Roche	04906837001
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs	M0491S
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific	EO0381
RnaseH	Lucigen	H39500
RnaseR	Lucigen	RNR07250
T4 DNA Ligase	New England Biolabs	M0202
T7 RNA Polymerase	Roche	10881767001
XhoI	New England Biolabs	R0146S

2.1.6 Zellkultur Material

Artikel	Hersteller	Katalog Nummer
0,4 cm Gene Pulser Küvette	Bio Rad	165-2088
100 mm, 150 mm TC-treated Cell Culture Dish	Falcon	353003, 353025

96 Well TC-Treated Microplates	Corning	3894
96-well Solid White Flat Bottom Polystyrene TC-treated Microplates	Corning	3917
Blasticidin	Invitrogen	R210-01
Counting Slides	Biorad	145-0011
CryoPure Gefäß 1,6ml	Sarstedt	380004
DMSO	Roth	A994.1
DPBS	Biochrom	L182-10
Fetal Calf Serum (FCS)	Bio&SELL	FBS. S 0615
G418	Biochrom	O887F
Multiwellplatte, 6 Well	Greiner	657160
Opti-Mem	Gibco	11058-021
Pasteurpipetten	Roth	4518.1
Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122
RPMI	Gibco	21875-034
Tetracyclin	Sigma Aldrich	60-54-8
Tetracyclin negatives Serum	Bio&SELL	FCS.TZN.0500
Trypan Blue Dye	Gibco	15250-061
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco	25300-054

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsartikel	Hersteller	Katalog Nummer
FrameStar® 96 Well Skirted PCR Plate	4titude	4ti-0960/C
High Clarity PP Centrifuge Tube, Conical Bottom, Sterile, 15mL, 50mL	Falcon	352096, 352070
Hybond-N+	GE Life Sciences	RPN203B
Nitrocellulose membrane 0.2µm / 0.45µm	Amersham	13600119
Novex™ 4-20% Tris-Glycine Mini Gels, WedgeWell™ format, 10-well	Invitrogen	XP04200BOX
PVDF Membrane 0,45µm	Roche	3010040001

RNA Screen Tape	Agilent	5067-5576
SafeSeal Reagiergefäße	Sarstedt	72.704, 72.706, 72.695.500
SafeSeal Tips Premium 1000µl, 100µl, 10µl steril	Biozym	692078, 690101, 692150
Serologische Pipetten 5mL, 10mL, 25mL	Falcon	357543, 356551, 357525

2.1.8 Primer und si-RNAs

Name	Sequenz (5`-3`)	Referenz
circSETD3 (hsa_circ_0000567)	F: TCCTTTGGTGACACAGTTGCT	Eigendesign
	R: ACTCCTTCTGGCAGCCCTAT	Danßmann
SETD3 mRNA	F: TGTTGGCATGAGGATGG	Eigendesign
	R: CCCTAACTCCTTCTGGCAGC	Danßmann
circARID1A (hsa_circ_0008494)	F: CTCCAGTAAGGGAGGGCAAG	Eigendesign
	R: TGTTGCTGCGAGTATGGGTT	Danßmann
ARID1A mRNA	F: AACCCAGACTCGGGGATGTA	Eigendesign
	R: GCCGCTTGTAATTCTGCTGT	Danßmann
circEYA1 (hsa_circ_0084764)	F: GGGTATGGTCTGTTGGAAGGG	Eigendesign
	R: ACAGATCCCACAGCAGTTAAA	Danßmann
EYA1 mRNA	F: AAAGTTGGCCTTCCGCTACA	Eigendesign
	R: CACAGTTTGTCCGGGAGTGA	Danßmann
circSMARCA5 (hsa_circ_0001445)	F: CTCCAAGATGGGCGAAAG	Conn, 2015
	R: TGTGTTGCTCCATGTCTAATCA	
SMARCA5 mRNA	F: GCTCCTCGACCTCCAAAAC	Conn, 2015
	R: TTGTGCCTGTGCTGCGT	
circTet2 (hsa_circ_0070562)	F: TGGATACACCTGTCAAGACTCAA	Eigendesign
	R: GGCAAATGGGAGGTGATGGTA	Danßmann
Tet2 mRNA	F: TGGATACACCTGTCAAGACTCAA	Eigendesign
	R: TGCCACATTAGGACCTGCTC	Danßmann
circHIPK3 (hsa_circ_0000284)	F: TATGTTGGTGGATCCTGTTCCGCA	Zheng 2016
	R: TGGTGGGTAGACCAAGACTTGTGA	
HIPK3 mRNA	F: AGTGCCAGAACAGGAGTAATTCA	Eigendesign
	R: CGGGGAGTCGGCAATAATGA	Danßmann

CDR1-AS (hsa_circ_0001946)	F: AGACCTTGAGATTATTGGAAGACTTGA	Memczak 2013
	R: TACCCAGTCTTCCATCAACTGGCT	
SDHA	F: TGGGAACAAGAGGGCATCTG	Vandesompele 2002
	R: CCACCACTGCATCAAATTCATG	
MAP2	F: TCTCTTCTTCAGCACGGCG	Capasso, 2014
	R: GGGTAGTGGGTGTTGAGGTACC	
TrkA	F: ACCATGCTGCCCATTCGCTG	Eigendesign
	R: GAGGGCAGGCCCCAGTATTC	AG Schulte
NES	F: CGGCTGCGGGCTACTG	Capasso, 2014
	R: AGCGATCTGGCTCTGTAGGC	
NEFL	F: TCAACGTGAAGATGGCTTTG	Eigendesign
	R: TTCCTCCACTTCGATCTGCT	AG Schulte
circARID1A gesamte circRNA-3	F: CTCAGCAGTCCCAGCAAAC	Eigendesign
	R: ACTGGGGCTGAGGATACGCA	Danßmann
circARID1A gesamte circRNA-4	F: CAGCAACAGGGACCTCCGTC	Eigendesign
	R: CGAGTATGGGTTAGTCCCGC	Danßmann
Laccase	F: CATTGAGAAATGACTGAGTTCC	Eigendesign
	R: CTGAGGTGCCACAGACTAATTG	Danßmann
circARID1A Northern Blot	F: CTCCAGTAAGGGAGGGCAAG	Eigendesign
	R: GATCCTAATACGACTCACTATAGGG GCTGTGTATAAGAGAGGCCG	Danßmann
siRNA-SCR-1	UAAUGUAUUGGAACGCAUA	Eurofins Genomics
siRNA-SCR-6	TGGACTGGTACGAGGCAAGCT	Eigendesign Danßmann
siRNA-4 (circARID1A)	CTGGATGGAGGCAAGCTGGAG	Eigendesign Danßmann
siRNA-6 (circARID1A)	TGGACTGGATGGAGGCAAGCT	Eigendesign Danßmann

2.1.9 Plasmide

Name**Hersteller****Katalog Nummer**

Gateway™ pT-Rex™-DEST30 Vector	Invitrogen	12301016
pcDNA3.1(+) Laccase2 MCS Exon Vector	Addgene Jeremy Wilusz	69893
pcDNA™6/TR vector Mammalian Expression Vector	Invitrogen	V102520

2.1.10 Antikörper

Zielprotein	Herkunft	Verwendung	Hersteller	Katalog Nummer
ARID1A	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	12354
Caspase-3	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9662
Vinculin	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	4650
GAPDH	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	5174
Kaninchen IgG	Ziege	1:5000	Dianova	111-005-003

2.1.11 Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinie	Ursprung	MYCN	TP53	Referenz
SK-N-SH	♀ 4 J. Metastase Knochenmark	non-amp	wt	(69)
SH-SY5Y	♀ 4 J. Sub Klon von SK-N-SH	non-amp	wt	(70)
GI-ME-N	♀ 3 J. Metastase Knochenmark	non-amp	wt	(71)
SH-EP	♀ 4 J. Sub Klon von SK-N-SH	non-amp	wt	(70)
IMR-5	♂ 1 J. Sub Klon von IMR-32 (Primärtumor Abdomen)	amp	wt	(72)
IMR-5/75	♂ 1 J. Sub Klon von IMR-32 (Primärtumor Abdomen)	amp	wt	(73)
KELLY	♀ 1 J. Primärtumor	amp	wt	(12)
LAN-5	♂ 4 M. Metastase Knochenmark	amp	wt	(74)
SK-N-BE(2)C	♀ 2 J. Metastase Knochenmark	amp	mut	(70)
SK-N-FI	♂ 11 J. Metastase Knochenmark	non-amp	mut	(75)
LS	♀ 1 J. 4 M. Primärtumor Abdomen	amp	wt	(76)
Bakterium	Stamm	Hersteller		

E.coli	XL10-GOLD	Agilent
--------	-----------	---------

2.2 Methoden

2.2.1 Tumorproben

Diese Studie stützt sich auf einen Datensatz, in dem 104 primäre Neuroblastome analysiert wurden. Die Patienten waren Teil klinischer Studien (NB97, NB2004, NB Register 2016). Das Einverständnis wurde zu Beginn der Studien durch die Patienten oder die Sorgeberechtigten eingeholt. Die Biopsien wurden durch die zentrale Neuroblastom Daten- und Tumorbank in Köln gesammelt und uns zur Verfügung gestellt. Die Zustimmung zu dieser Studie wurde von der Ethikkommission erteilt.

2.2.2 Zellbiologie

2.2.2.1 Kultivierung von Neuroblastom Zelllinien

Sämtliche Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden in RPMI Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert und bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung inkubiert. Als Kultivierungsgefäße wurden vorwiegend 10cm und 15cm Schalen mit 10ml bzw. 25ml Medium Inhalt verwenden. Alle 2-5 Tage erfolgte bei 85% Konfluenz eine Passage der Zellen, wobei die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 gesplittet wurden. Hierzu wurde das Medium entfernt und die adhärenen Zellen mit 5ml bzw. 8ml DPBS gewaschen und mit 1ml bzw. 2ml Trypsin für 5 Minuten im Inkubator bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 8-9ml Medium gestoppt und die Zellen anschließend auf neue Kulturschalen verteilt.

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen bei -80°C in 1ml FCS mit 10% DMSO kryokonserviert. Ein erneutes Auftauen erfolgte bei 37°C im Wasserbad mit anschließendem

Transfer in vorgewärmtes Medium. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um das toxische DMSO zu entfernen.

2.2.2.2 Zellzahlen

Zellzahlen wurden mittels des *TC20™ Automated Cell Counters* bestimmt. Um die Zell Viabilität zu detektieren wurde 0,4%iges Trypan Blau in einem 1:1 Verhältnis mit der Zelllösung gemischt, nach Herstellerangaben in die Zählkammer gegeben und gezählt.

2.2.2.3 Proliferation

Zellproliferation wurde mittels des *IncuCyte® S3 Live Cell Systems* gemessen. Hierzu wurden Zellen wie in 2.2.3.10 näher beschrieben in 5 Replikaten auf einer 96-Well Platte ausgesät und für 96 Tage inkubiert, wobei alle 3h 4 Fotos pro Well in einer 10x Vergrößerung aufgenommen wurden. Die Rohdaten wurden mit der *IncuCyte® S3 Software* (Essen Bioscience) durch Konfluenz Messung nach Herstellerangaben analysiert. Die berechnete *Area Under The Curve* (AUC) diente der weiteren statistische Analyse.

2.2.2.4 Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zell Viabilität nach circRNA Knockdown oder Überexpression wurde neben der Färbung mit Trypan Blau (siehe 2.2.2.2) ein *CellTiter-Glo® Cell Viability Assay* durchgeführt. Dieses bestimmte den ATP Gehalt der Kultur, welcher direkt proportional zu der Anzahl der lebenden Zellen ist. Neuroblastom-Zellen wurden auf 96-Well-Platten mit weißem Boden gesät und Knockdown (siehe 2.2.2.5) bzw. Überexpression (siehe 2.2.2.6) in drei Replikaten durchgeführt. Neben den Standard-Kontrollen wurden drei Replikate Medium für die Hintergrund-Korrektur mitgeführt.

Nach erfolgtem Knockdown bzw. Überexpression wurden die Platten für 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde das CellTiter-GLO Reagenz in einem 1:10

Verhältnis hinzugefügt und für 2 Minuten bei 180rpm auf einem Orbitalschüttler gemischt. Nach weiteren 8 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lumineszenz mittels des *Glomaxx Multi + Detection Systems* gemessen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Hintergrundkontrolle subtrahiert und die Differenz in Verhältnis zu der Kontrolle gesetzt.

2.2.2.4 Zellfraktionierung

Zur Analyse der Lokalisation von circRNAs in Neuroblastom wurden Zellkerne und Zytoplasma der Zellen getrennt und anschließend per qRT-PCR analysiert. Für die Fraktionierung habe ich die „*Rapid, efficient and practical*“ (REAP) Methode, welche 2010 von Suzuki, Keiko *et. al.* veröffentlicht wurde (77) angepasst und in der AG Schulte etabliert.

IMR-5 Zellen wurden in einer 10cm Schale bis zu 85%iger Konfluenz kultiviert, anschließend geerntet und bei 300g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zell-Pallet in 1ml eiskaltem NP40 (0.1%) suspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit bei Raumtemperatur für 3 Minuten. Der Überstand wurde als zytoplasmatische Fraktion in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Das Pellet wurde erneut mit 1ml eiskaltem NP40 (0,1%) gewaschen und bei maximaler Geschwindigkeit bei Raumtemperatur für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das verbleibende Pellet als nukleäre Fraktion gesichert. Beide Proben wurden direkt mit je 1ml Trizol vermengt und wenn nicht direkt weiterverarbeitet bei -80°C gelagert.

2.2.2.5 siRNA Knockdown

Für die funktionelle Analyse von circARID1A wurde ein *Knockdown* mittels *small interfering RNAs* (siRNAs) durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten siRNAs können Tabelle 2.1.8 entnommen werden. Als Kontrolle diente eine *Random scrambled* siRNA. Für die Transfektion auf 6-Well-Platten wurden 4µl siRNA [20µM] und 4µl Lipofectamine3000 zu 400µl Opti-Mem

gegeben, gevortext und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionslösung wurde in die Wells gegeben und 1,6ml Zellsuspension hinzugefügt. Es wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen IMR-5 oder $1,5 \cdot 10^5$ Zellen SH-SY5Y ausgesät. Für die Transfektion auf 96-Well-Platten bestand die Transfektionslösung aus 0,2µl siRNA [20µM], 0,2µl Lipofectamine3000 und 20µl Opti-Mem, zu der je 80µl Zellsuspension gegeben wurde. Es wurden $6 \cdot 10^3$ Zellen IMR-5 oder $4,5 \cdot 10^3$ Zellen SH-SY5Y ausgesät. Die Zellen wurden für 96h bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung inkubiert und anschließend geerntet oder analysiert.

2.2.2.6 Überexpression

Für die Überexpression wurden $1,5 \cdot 10^4$ Zellen SHEP_TR_pDEST_Laccase_circARID1A bzw. SHEP_TR_pDEST_Laccase_EV in 2ml Medium pro 6-Well ausgesät. Nach 24h wurde das Medium gewechselt und je 2µg/ml Tetrazyklin bzw. das entsprechende Volumen Ethanol als Kontrolle hinzugefügt. Nach 96h wurde der Versuch beendet, die Zellen gezählt und in Trizol geerntet. Für die Überexpression im 96-Well Format wurden 1500 Zellen in 100µl Medium ausgesät und wie im 6-Well Maßstab bearbeitet.

2.2.2.7 Rescue Experiment

Um die Expression von circARID1A nach *Knockdown* wiederherzustellen, wurde ein *Rescue* Experiment durchgeführt. Zellen der Zelllinien IMR-5_TR_pDEST_Laccase_circARID1A bzw. SH-SY5Y_TR_pDEST_Laccase_circARID1A wurden wie in 2.2.2.5 beschrieben mit siRNAs transfiziert. Nach 24h wurde das Medium wie in 2.2.2.6 gewechselt und Tetracyclin bzw. Ethanol als Kontrolle hinzugefügt, um eine Expression von circARID1A zu induzieren. Die Zellen wurden nach 96h gezählt und in Trizol geerntet.

2.2.3 Molekularbiologie

2.2.3.1 Primer-Design

Um potenzielle circRNAs zu detektieren, wurden Primer designiert, welche sich divergent gegen die circRNA-spezifische Ringschlussverbindungen richteten, sodass ein PCR-Produkt nur generiert werden konnte, wenn eine ringförmige RNA vorlag. Die Koordinaten der Ringschlussverbindungen wurden dem zuvor in der AG Schulte generierten RNA-Sequenzierungsdatensatz entnommen und mit der circBase Datenbank (34) abgeglichen. Unter der Annahme, dass die circRNA Kandidaten aus Exons bestanden und alle Exons zwischen der Ringschlussverbindung erhalten seien, wurden die Sequenzen aus Ensembl (78) in SnapGene®Viewer (GSL Biotech LLC) übertragen.

Für die Generierung spezifischer Primer wurde NCBI Primer-BLAST (79) verwendet. Es wurde eine Produktgröße von 100–180nt vorausgesetzt. Ausgewählte Primer wurden zudem in dem Online Tool Primer3Plus (80) auf die Bildung von Primer-Dimeren und *Hairpins* sowie ihre Stabilität überprüft.

Vielversprechende Primer wurden bei Eurofins Genomics in einer Konzentration von 100pmol/µl bestellt, auf 10pmol/µl verdünnt und anschließend per PCR und qRT-PCR, inklusive Meltcurve Analyse nach Standardprotokoll, validiert.

2.2.3.2 siRNA-Design

Um circARID1A herunterzuregulieren, wurden *small interfering RNAs* (siRNAs) designiert, welche die Ringschlussverbindung der circRNA binden. Als mögliche Zielsequenz wurden die 30 an die Ringschlussverbindung grenzenden Nukleotide in Erwägung gezogen. Mittels des Online Tools siSPOTR (81) wurden siRNAs kreiert und anschließend nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- 1) Die siRNAs sollten die Ringschlussverbindung mindestens über 7 Nukleotide überlappen
- 2) siRNAs, die mit einem Guanin am 5`Ende oder einem Adenin am 3`Ende begannen, wurden bevorzugt
- 3) Der GC-Gehalt sollte zwischen 30% und 55% liegen
- 4) Die siRNA Sequenz sollte keine bekannten *miRNA Seeds* tragen.

Sequenzen vielversprechender Kandidaten wurden zudem durch das NCBI BLAST Online Tool (82) auf Off-target-Bindung im humanen Genom überprüft.

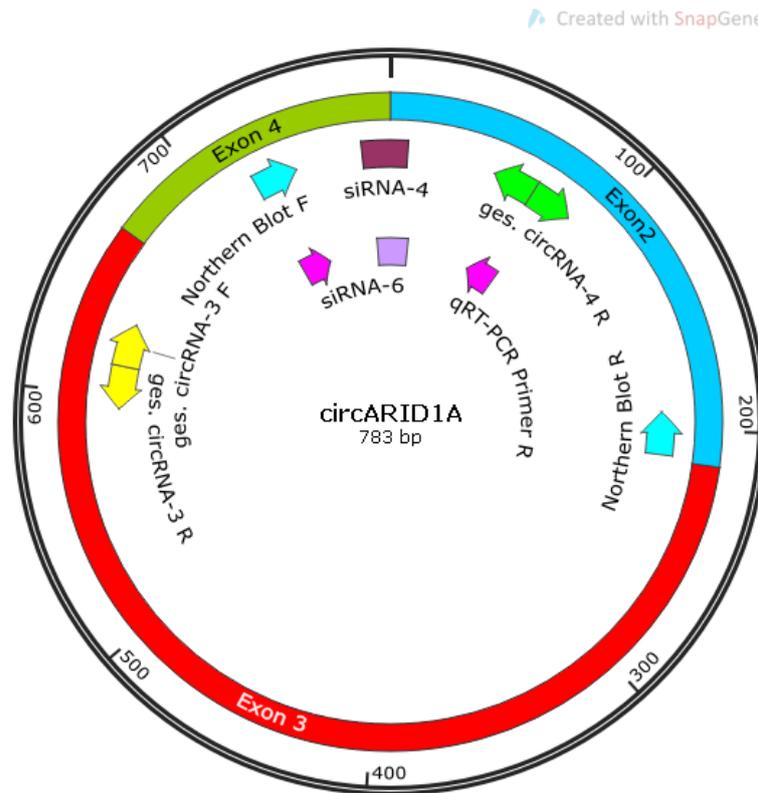
Als Kontrolle wurde eine *scrambled* siRNA (siRNA-SCR-1) verwendet, welche keine bekannten Bindestellen im humanen Genom hat. Mit dem Ziel Off-Target-Effekte zu demaskieren haben wir

für die RNA-Sequenzierung des Knockdowns zusätzlich eine spezifische C911 *scrambled* siRNA (siRNA-SCR-6) generiert. Buehler *et. al.* zeigten 2012, dass ein Austausch der Basen 9-11 durch ihre komplementären Basen, eine spezifische Bindung an die Ziel-RNA verhindert, Off-Targets aber weiterhin herunterreguliert werden (83).

2.2.3.3 Generierung von Northern Blot Sonden

Die Synthese der Northern Blot Sonde wurde von der technischen Assistentin Annika Winkler durchgeführt.

Zunächst wurde eine Sequenz von 275 Nukleotiden, welche die Ringschlussverbindung enthielt, aus cDNA der Zelllinie IMR-5 amplifiziert. Die PCR mit Q5 High-Fidelity Polymerase und die anschließende Aufreinigung der Produkte erfolgte wie in 2.2.3.7 beschrieben. Die verwendeten Primer können Tabelle 2.1.8 entnommen werden. Es folgte eine reverse Transkription mittels T7 Polymerase. Eine Bindung der Polymerase wurde durch die T7-Promotor Sequenz im Reverse-Primer ermöglicht. Für die Reaktion wurden 10µl DNA, 2µl 10x DIG-RNA Labeling Mix, 2µl 10x Transkriptionspuffer, 4µl Nuklease-freies Wasser und 2µl T7 RNA Polymerase in einem Mikroreaktionsgefäß vermennt und für 2h bei 37°C und 300rpm in einem Thermomixer inkubiert. Die anschließende Fällung der RNA erfolgte durch Hinzufügen von 2µl Natrium Azetat (3 M) und 60 µl 100% Ethanol. Die Probe wurde gemischt, bei -20°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend bei 4°C bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500µl Ethanol gewaschen, bei geöffnetem Deckel getrocknet und in 100µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Die Konzentration wurde mittels NanoDrop 2000 Spektralphotometers gemessen. Wenn nicht direkt verwendet, wurden die generierten Sonden bei -80°C gelagert.



Grafik 5: Primer zum Nachweis und siRNAs zum *Knockdown* von circARID1A. Um circRNAs spezifisch nachzuweisen, wurden Primer designt, mit denen die Ringschlussverbindung amplifiziert werden kann. Auch die Sonden für den *Northern Blot* und die siRNAs richten sich spezifisch gegen die Ringschlussverbindung, sodass eine Bindung an die mRNA minimiert wird.

2.2.3.4 RNA Isolierung

Zellen, aus denen RNA extrahiert werden sollte, wurden direkt in 1ml Trizol geerntet und in ein 2ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Durch kräftiges Pipettieren wurden die Proben homogenisiert und anschließend für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurden 0,2ml Chloroform zu 1ml Trizol gegeben und die Reaktionsgefäße anschließend für 15 Sekunden geschüttelt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zentrifugierung für 15 Minuten mit 11200rpm bei 4°C in einer Tischzentrifuge. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues 1,5ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Es wurden erneut 0,2ml Chloroform hinzugegeben und für 5 Minuten mit 11200rpm bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase in ein neues 1,5ml Mikroreaktionsgefäß gegeben. Zur RNA Präzipitation wurden zu jeder Probe 0,5µl Glycogen und 0,5ml Isopropanol gegeben und anschließend für 10

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation mit 13000rpm bei 4°C. Das gewonnene Pellet wurde mit 1ml 75%igem Ethanol gewaschen und mit 8900rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde entfernt und die Pellets für 10 Minuten mit geöffnetem Deckel bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde anschließend in 30µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und abschließend für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Die RNA-Konzentration wurde auf dem *NanoDrop 2000* Spektralphotometer gemessen. Sofern nicht direkt weiterverwendet, wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.2.3.5 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das *Maxima First Strand cDNA Synthesis kit for Total RNA* verwendet. Wenn möglich wurde 1µg RNA eingesetzt und nach dem Herstellerprotokoll verarbeitet. Zusammengefasst wurde zunächst ein dsDNase Verdau durchgeführt, um mögliche Verunreinigungen mit gDNA zu beseitigen. Hierzu wurden pro Reaktion 1µl dsDNase Puffer, 1µl dsDNase und RNA in 8µl H₂O für 3 Minuten bei 37°C im *C1000 Touch PCR Cycler* inkubiert. Anschließend wurden 0,5µl *Random Hexamer Primer* und 1µl dNTPs, sowie 3,5µl H₂O hinzugefügt und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturen zu lösen. Die finale reverse Transkription erfolgte durch Hinzufügen von 4µl RT-Puffer und 1µl Enzym Mix (0,5µl Reverse Transkriptase und 0,5µl RiboLock) und Inkubation unter folgenden Temperaturbedingungen: 10 Minuten bei 25°C, gefolgt von 15 Minuten bei 50°C und 5 Minuten bei 85°C. Sofern nicht direkt weiterverwendet, wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

2.2.3.6 PCR und Gelelektrophorese

Für die initiale Validierung der Primer verwendeten wir ein standardisiertes PCR Protokoll für die DNA-Amplifizierung. Hierzu wurden 7,5µl KAPA Polymerase Mix, 4,5µl H₂O, 1µl *Forward-Primer*, 1µl *Reverse-Primer* und 1µl cDNA gemischt. Die DNA wurde in einem *C1000 Touch PCR Cycler* unter folgenden Temperaturschritten amplifiziert: 5 Minuten bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen von 10 Sekunden bei 95°C, 15 Sekunden bei einer Primer-spezifischen Binde-Temperatur und 10 Sekunden bei 72°C, eine finale Elongation für 5 Minuten bei 72°C. Sofern nicht direkt weiterverwendet wurden die Produkte bei -20°C gelagert.

Die Auftrennung der Fragmente nach Größe per Gelelektrophorese erfolgte in einem 3%igem Agarose Gel basierend auf TAE Puffer. Die DNA-Markierung erfolgte mit 200µl Ethidiumbromid pro 150ml Gel. Die Proben wurden mit 5µl Laufpuffer markiert. Für eine Zuordnung der Größen wurde eine 100bp Leiter mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 90 Minuten bei 90V. Fotos wurden mit dem DOC-print VX5 Kamera System aufgenommen.

2.2.3.7 Sanger Sequenzierung

In Vorbereitung auf die Sequenzierung nach Sanger wurde zunächst eine PCR mit *Q5 High-Fidelity Polymerase* durchgeführt. Hierfür wurden 10µl 5x Q5 Reaktionspuffer, 0,5µl dNTPs (20mM), 2,5µl *Forward-Primer* (10µM), 2,5µl *Reverse-Primer* (10µM), 2µl cDNA und 0,5µl *Q5 High-Fidelity Polymerase* vermischt und mit H₂O auf 50µl aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem *C1000 Touch PCR Cycler*: 30 Sekunden bei 98°C, gefolgt von 35 Zyklen von 10 Sekunden bei 98°C, 30 Sekunden bei einer Primer-spezifischen Bindetemperatur berechnet durch das *NEB Tm Calculator Tool* (Version 1.12.0) und 20 Sekunden bei 72°C, eine finale Elongation für 10 Minuten bei 72°C. Sofern nicht direkt weiterverwendet wurden die Produkte bei -20°C gelagert.

Die Auftrennung erfolgte mittels Gelelektrophorese in einem 1%igem Agarose-Gel wie in 2.2.3.5 beschrieben. Die entstandenen Produkt-Banden wurden ausgeschnitten und mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Hersteller Protokoll aufgereinigt.

Die DNA-Konzentration wurde mittels des NanoDrop 2000 Spektralphotometers gemessen. Es wurden 200ng DNA in 15 µl H₂O mit je 1µl *Forward-* und *Reverse-Primer* in getrennten Ansätzen vermischt und durch Eurofings Genomics nach Sanger Sequenziert.

2.2.3.8 Quantitative Real Time PCR

Für die quantitative Real Time PCR wurde das *FastStart Essential SYBR® Green Master Assay* für 96 Wells verwendet. Hierzu wurde 1µl cDNA zu 5µl SYBR® Green Master Mix, 3,5µl Nuklease-freiem Wasser und 0,5µl *Forward*- und 0,5µl *Reverse*-Primer gegeben. Die Primer-Sequenzen können Tabelle 2.1.8 entnommen werden. Als *Houskeeper* diente *Succinate dehydrogenase (SDHA)*, welches stabil in Neuroblastom-Zellen exprimiert ist (84).

Die PCR wurde im StepOnePlus Real-Time PCR System unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2 Minuten bei 50°C, 10 Minuten bei 95°C, 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei 95°C. Die *threshold cycle values* (Ct) wurden mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet (85).

2.2.3.9 *RnaseR* Assay

Um die zirkuläre Struktur von circRNA-Kandidaten zu bestätigen, habe ich das RNase-R Assay in der AG Schulte etabliert. Die Exoribonuklease RNase-R degradiert lineare RNAs vom 3`- zum 5`-Ende, sodass circRNAs weitestgehend gegen dieses Enzym resistent sind, da sie kein freies lineares Ende besitzen (31).

Für den Verdau wurde 1µg aufgereinigte RNA mit 3 Units RNase-R, 0,5µl RiboLock RNase Inhibitor und 1µl 10x RNase-R Reaktionspuffer in einem Mikroreaktionsgefäß vermengt und mit H₂O auf 10µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben bei 37°C für 30°C inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine Degradierung der RNA zu verhindern. Für jede Probe wurde eine Kontrolle mitgeführt, die Nuklease-freies Wasser statt RNase-R enthielt. Die Reaktionsprodukte wurden auf ein finales Volumen von 30µl verdünnt und anschließend mit magnetischen *AMPure XP Beads* aufgereinigt, um die RNase-R zu entfernen, da eine thermische Inaktivierung nicht möglich war. Die *AMPure XP Beads* wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur erwärmt und 54µl zu jeder Probe behandelte RNA gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden für 5 Minuten in einen DynaMag™-PCR Magneten gestellt und der Überstand, der die RNase-R enthielt, entfernt. Die Beads wurden zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen und anschließend für 5 Minuten getrocknet. Die RNA-Beads-Komplexe wurden in 20µl Nuklease freiem H₂O suspendiert und verweilten 2 weitere Minuten auf dem Magneten, bevor der wässrige Überstand, welcher die aufgereinigte RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt wurde. Die RNA Konzentration wurde

anschließend auf dem NanoDrop 2000 System gemessen. Für cDNA Synthese wurden 8µl RNA eingesetzt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3.10 Northern Blot

Der Northern Blot wurde von der technischen Assistentin Annika Winkler durchgeführt.

Die verwendete RNA wurde zunächst wie in 2.2.3.4 beschrieben, isoliert. Für den Northern Blot wurden 50µg RNA gelöst in 10µl Nuklease-freiem Wasser eingesetzt und in einem 1:1 Verhältnis mit dem *NorthernMax™-Gly Sample Loading Dye* vermengt. Von dem *RNA Molecular Weight Marker* wurden 3µl entnommen und mit 7µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt und ebenfalls in einem 1:1 Verhältnis mit dem *NorthernMax™-Gly Sample Loading Dye* vermengt. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 50°C inkubiert.

Die gesamte RNA wurde auf ein Gel aus 1-fach MOPS Puffer mit 1,5% Agarose gegeben und eine Gelelektrophorese bei 100V für 90 Minuten im Mini-PROTEAN® Tetra-System mit 1-fach MOPS Puffer durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 20 Minuten in 1-fach TBE Puffer bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Die Hybond N+ Membran wurde 5 Minuten unter denselben Bedingungen inkubiert.

Es wurden 2 Blätter in 1-fach TBE getränkte Whatman-Papiere, die Hybond N+ Membran, das Gel und wiederum 2 Blätter Whatman-Papiere in dieser Reihenfolge von unten nach oben in das Trans-Blot Turbo System gegeben und bei 15V und 2,5mA für 1h geblottet.

Die Membran wurde bei Raumtemperatur getrocknet und bei 1200mJoule im UV Stratalinker 1800 gecrosslinked. Der erfolgreiche Transfer von dem Gel auf die Membran wurde unter UV-Licht überprüft und die Membran zugeschnitten.

Die Membran wurde für 10 Minuten bei 68°C in 10ml 50mM Tris (pH 8) bei Drehung inkubiert, gefolgt von einer Inkubation in 5ml NorthernMax™ Hybridisierungs-Puffer für mindestens 30 Minuten bei 68°C (Prähybridisierung). Es wurden 50ng Sonde in 10µl Nuklease-freiem Wasser für 2 Minuten bei 98°C Inkubiert und anschließend zu dem NorthernMax™ Hybridisierungs-Puffer gegeben. Die Membran wurde bei 68°C über Nacht unter ständigem Drehen in Hybridisierungssofen inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgten die Stringenz-Waschungen. Hierbei wurde die Membran mit auf 68°C vorgewärmten SSC-Lösungen bei 68°C wie folgt gewaschen: einmal 1 Minute mit 25ml 2xSSC,0.1%SDS, zweimal 30 Minuten mit 10ml 2x SSC, 0.1% SDS, zweimal 30 Minuten mit 10ml 0.2x SSC, 0.1% SDS, einmal 1h mit 10ml 0.2x SSC, 0.1% SDS.

Anschließend, wurde die Membran in 5ml Waschpuffer bestehend aus cis-Butendisäure Puffer mit 0.3% Tween20 bei Raumtemperatur equilibriert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 1h in 10ml cis-Butendisäure Puffer gelöster Blockier-Reagenz bei Raumtemperatur inkubiert. Der Puffer wurde mit 10ml frischen Blockier-Puffer mit anti-DIG-AP Fab Fragmenten in einer Konzentration von 1:10000 ausgetauscht und die Membran für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten 4 Waschschritte in neuen Gefäßen mit 5ml Waschpuffer für je 15 Minuten. Die Membran wurde für 2 Minuten unter kontinuierlichem Schwenken in 10ml Detektionspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde mit CDP-*Star*[®] benetzt und die Chemilumineszenz nach 5-10 Minuten in dem Fusion FX (Vilber) mit der VisionCapt Software (Vilber) detektiert.

2.2.3.11 Total RNA Sequenzierung

Die RNA wurde wie in 2.2.3.4 beschrieben isoliert. Alle weiteren Schritte wurden durch Dr. med. Steffen Fuchs durchgeführt. Die Integrität der RNA wurde auf einem *RNA Screen Tape* mit dem *4200 TapeStation* System überprüft, wobei ein Wert von mindestens 8 als akzeptabel bewertet wurde. Die ribosomale RNA wurde durch einen enzymatischen Verdau mit RNase H, wie zuvor von Adiconis *et al.* im Jahr 2013 beschrieben, abgebaut. In der Regel konnte eine Reduktion der ribosomalen RNA um 95-99% erreicht werden. Die Proben wurden anschließend mittels des *TruSeq Stranded mRNA Kits* nach Herstellerangaben für die Sequenzierung vorbereitet und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

Die *Total RNA Next Generation* Sequenzierung erfolgte auf einem HiSeq4000 (Illumina, San Diego, USA) durch die Arbeitsgruppe von Dr. Sascha Sauer am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC, Berlin). Die cDNA wurde von beiden Enden (*Paired-End* Sequenzierung) mit einer Lesebreite von 2x150 Nukleotiden sequenziert. Pro Probe wurden im Mittel 100 Millionen Sequenzen generiert.

Die Daten wurden durch den Bioinformatiker Filippos Klironomos analysiert, wobei die Analyse der differentiellen Expression mittels DESeq2 in R durchgeführt wurde. Die Ergebnisse wurden in MA-Plots dargestellt.

2.2.3.12 Generierung von Überexpressionsmodellen

Für die Überexpression von circARID1A wurde der Plasmid pcDNA3.1(+) Laccase2 MCS Exon Vector von Jeremy Wilusz (Addgene plasmid #69893) modifiziert. Dieses beinhaltet die flankierenden Introns des *Laccase2*-Gens aus *Drosophila melanogaster*. Kamer *et al.* zeigten 2015, dass diese die Zirkularisierung von dazwischen geschalteten Genen durch lange komplementäre Basensequenzen, welche einander binden, begünstigen (86).

Zunächst wurde aus cDNA der Zelllinie SH-SY5Y in Passage 1 die circARID1A Sequenz mit dem Primer Paar „circARID1A gesamte circRNA-3“ mit Anhang von Bindestellen für die Enzyme AgeI und PacI durch Q5 High Fidelity Polymerase amplifiziert und aufgereinigt. Dies erfolgte im dreifachen Ansatz nach Protokoll wie in 2.2.3.6 beschrieben. Für den Verdau des Vektors wurden 5µl DNA, 5 µl CutSmart Puffer (10x), 20U PacI und 20U AgeI vermengt und mit H₂O auf 50µl aufgefüllt. Für den Verdau des PCR-Produkts wurden 40µl DNA mit 5µl 10x Puffer, 20U PacI und 20U AgeI vermengt. Alle Proben wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Vektor wurde anschließend durch Hinzufügen von 6µl AP-Puffer (10x) und 4µl alkalische Phosphatase bei 37°C für 30 Minuten dephosphoryliert. Die alkalische Phosphatase wurde 10 Minuten bei 72°C hitzeinaktiviert. Zur Überprüfung der korrekten Fragmentierung wurde eine Gelelektrophorese auf einem 1%igen Agarose Gel durchgeführt und passende Fragmente mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Hersteller Protokoll aufgereinigt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C durch Vermengen von 25ng Insert (circARID1A), 75ng Vektor (Laccase), 2µl T4 DNA Ligase Reaktionspuffer (10x) und 1µl T4 DNA Ligase, aufgefüllt mit H₂O auf 20µl.

Für die Transformation wurden 200µl chemisch kompetente Bakterien mit dem ligierten Vektor für 30 Minuten auf Eis inkubiert, für 90 Sekunden bei 42°C erhitzt und weitere 2 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 800µl LB-Medium hinzugegeben und für 1h bei 37°C bei 550rpm geschüttelt. Die Lösung wurde für 2 Minuten bei 25°C und 5000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl LB-Medium gelöst und auf einer LB-Agarplatte unter Zusatz von 100µg/ml Ampicillin ausplattiert.

Nach 24h wurden gewachsene Bakterienkulturen mit Zahnstochern gepickt, in 4ml LB-Medium unter Zusatz von 100µg/ml Ampicillin gegeben und über Nacht inkubiert.

Zur Isolation der Plasmide wurden zunächst 1,5ml der Übernachtskulturen in Eppendorf-Gefäßen geerntet (Zentrifugation bei 5000rpm, 2min). Dann erfolgte eine Vereinzelnung der Bakterien durch Resuspendierung des Pellets in 200µl Qiagen Puffer 1. Die Bakterien wurden lysiert durch Zugabe von 200µl Qiagen Puffer 2 gefolgt von 8-maligem Invertieren der Eppendorf-Gefäße. Durch Zugabe von 200µl Qiagen Puffer 3 und 8-maligem Invertieren, wurde die Lyse gestoppt und die Lösung wieder neutralisiert. Um die Plasmide vom Debris abzutrennen, wurden die Proben, 10 min auf höchster Stufe, bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch Zugabe von 800µl Isopropanol, kurzem Vortexen und einem 30-minütigem Zentrifugationsschritt (höchste Stufe, 4°C), die Plasmide präzipitiert. Das entstandene DNA pellet wurde mit 500µl 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl 0.1xTE-Puffer gelöst. Isolierte Plasmide wurden im Anschluss testverdaut um positive Klone zu finden.

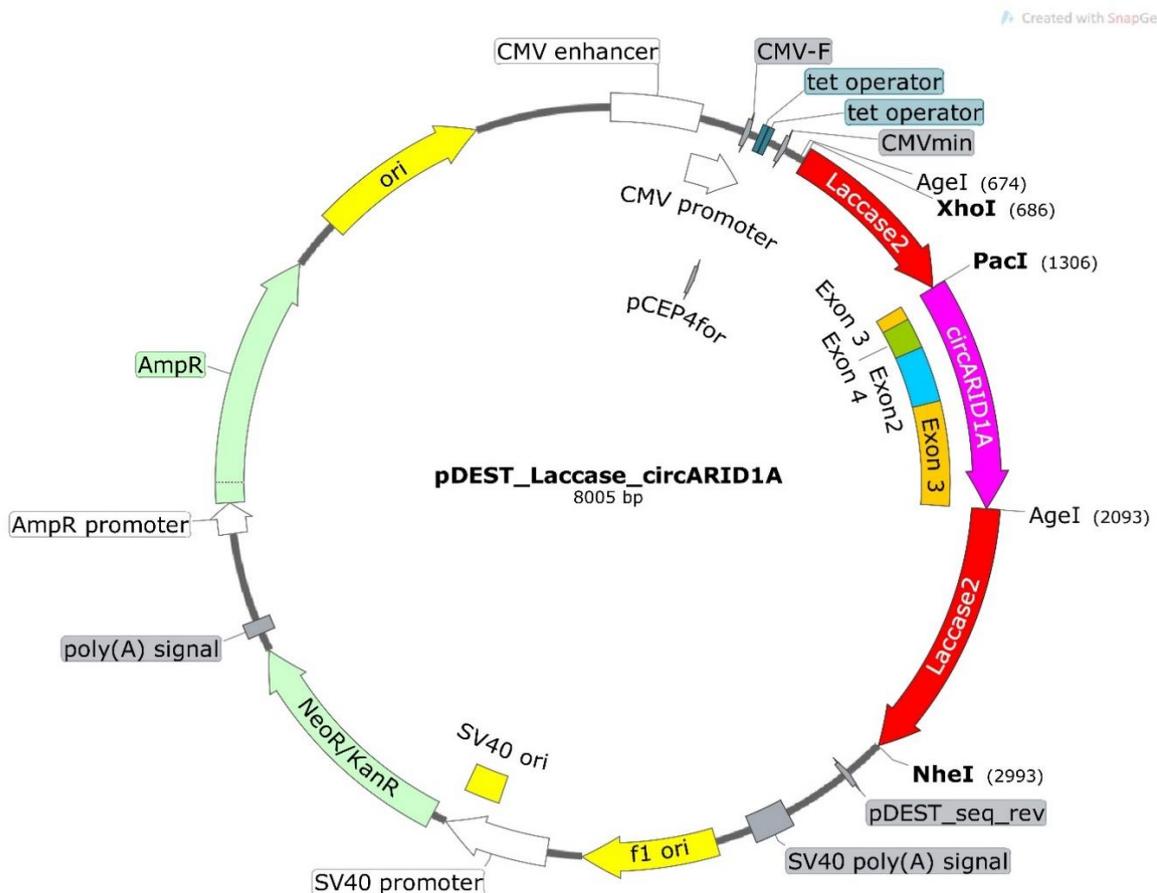
Dazu wurden 5µl Plasmid-DNA, 3µl NEBuffer™ 2.1 und je 0,25 µl HindIII und XhoI, aufgefüllt mit H₂O auf 30 µl über Nacht bei 37°C verdaut und mittels Gelelektrophorese analysiert, um zu kontrollieren welche Bakterien den gewünschten Vektor integriert hatten.

Bakterien, welche das erwünschte Plasmid trugen, wurde über Nacht in einem größerem Maßstab angesetzt (200ml LB-Medium, 100µg/ml Ampicillin) und am Folgetag eine Plasmid Aufreinigung mit dem Nucleo Bond Maxi Kit nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Nun sollte die circARID1A Sequenz mit flankierenden Laccase2-Introns in den Gateway™ pT-Rex™-DEST30 Vektor kloniert werden, welcher den Tet-Operator enthält. Dies erlaubt eine Tetrazylin induzierte Expression der circRNA. Die Sequenz wurde mit Anhang von Bindestellen für die Enzyme XhoI und NheI wie zuvor beschrieben durch Q5 High Fidelity Polymerase amplifiziert und aufgereinigt. Es erfolgte ein Verdau mit XhoI und NheI in CutSmart Puffer (10x) und eine anschließende Ligation nach beschriebenem Protokoll, gefolgt von der Transformation chemisch kompetenter Bakterien und der Aufreinigung der Plasmide. Das finale Plasmid enthielt nun u.a. die circARID1A Sequenz mit flankierenden Laccase2 Introns, einen Tet-Operator, und eine G418 Resistenz. Für weitere Details siehe Grafik 5.

Zur Transfektion des neuen Plasmids, wurden bereits etablierte stabile Neuroblastom Zelllinien verwendet, welche den pcDNA™6/TR Vektor (kodiert für den Tet-Repressor) enthielten. Genauer wurden SH-SY5Y_TR, IMR-5_TR und SHEP_TR Zellen in 80% Konfluenz von 15cm

Zellkulturschalen geerntet und dreimal mit DPBS gewaschen. $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Zelllinie wurden in Opti-Mem suspendiert und mit $20 \mu\text{g}$ des gewünschten Plasmids in eine 0,4 cm Gene Pulser Küvette transferiert. Die Zellen wurden anschließend in einem Gene Pulser Xcell System mit 200V, 20ms und einer 1 Pulsabgabe nachdem Squarewave-Protokoll elektroporiert und anschließend auf eine 10cm Schale ausgesät. Nach 48h wurde das Medium durch RPMI Medium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin und $800 \mu\text{g}/\text{mL}$ G418 gewechselt, um erfolgreich transfizierte Zellen zu selektieren.



Grafik 6: Klonierungsstrategie zur Überexpression von circARID1A. Der Gateway™ pT-Rex™-DEST30 Vektor enthält einen Tet Operator. Durch die Integration der circARID1A Sequenz und flankierender Laccase2-Introns wird eine Tetrazylin induzierte Expression der circRNA möglich.

2.2.4 Proteinbiochemie

2.2.4.1 SDS PAGE und Western Blot

Geerntete Zellen wurden in DPBS gewaschen und anschließend in 25µL Protein Lysis Buffer mit Protease Inhibitor und Phosphatase Inhibitor für 30 Minuten auf einem Orbitalschüttler lysiert. Nach einer Zentrifugation für 30 Minuten bei 14000rpm bei 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sein Proteingehalt mittels BCA Protein Assay nach Herstellerangaben bestimmt. Für die Kalibrierung wurde eine Standardkurve mit Bovinem Serum Albumin in Konzentrationen von 0µg/mL bis 2000µg/mL erstellt. Die Absorbanz wurde mittels des *Epoch Microplate Readers* bei 562nm gemessen. 20µg Protein Lysat wurden mit 4µL 4x Lämmli Puffer gemischt, mit H₂O auf 15µL aufgefüllt und für 10 Minuten bei 95°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzubrechen. Die Protein-Proben wurden anschließend auf ein 4-20% Tris-Glycine Mini Gel gegeben. Für die Größenbestimmung wurde zudem die Precision Plus Protein™ Standard Leiter in ein Well pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde im Mini-PROTEAN® Tetra-System mit NuPAGE MOPS SDS Lauf Puffer für 90 Minuten durchgeführt. Die Spannung wurde in den ersten 30 Minuten auf 80V und in der verbleibenden Zeit auf 100V eingestellt.

Die separierten Proteine wurden anschließend mittels Wet-Blot auf eine PDVF Membran transferiert. Die Membran wurde für 5 Sekunden in Methanol aktiviert und mit in Transferpuffer getränkten Nitrozellulose Membran und Blotting-Schwamm in folgender Reihenfolge in ein Gitter gespannt: Schwamm, 2x Nitrozellulose Membran, PDVF Membran, Gel, 2x Nitrozellulose Membran, Schwamm. Das Gitter wurde in die Laufkammer gespannt und in 2l Transferpuffer (160ml 10x Transferpuffer, 400ml Methanol, 1440ml H₂O) bei 90V, 280A für 90 Minuten bei 4°C geblottet.

Die Membran wurde anschließend für 1h in TBST mit 10% Magermilchpulver bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren. Der Primärantikörper wurde in TBST mit 5% Magermilchpulver 1:1000 verdünnt und gemeinsam mit der PDVF Membran in einem 50ml Reaktionsgefäß bei 4°C über Nacht bei Rotation inkubiert. Nach einem dreifachen Waschvorgang mit TBST für je 10 Minuten wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in 1:5000 Verdünnung in TBST mit 5% Magermilchpulver für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde erneut drei Mal in TBST gewaschen und das Antikörper-Signal mittels Chemilumineszenz-Reagenz in dem Fusion FX (Vilber) mit der VisionCapt Software (Vilber) detektiert. Vinculin oder GAPD dienten als interne Ladekontrolle.

2.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2016 und GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego). Ergebnisse, die mittels qRT-PCR generiert wurden, wurden mittels $2^{\Delta\Delta CT}$ -Formel (relative Quantifizierung) oder $2^{\Delta CT}$ -Formel (absolute Quantifizierung) ausgewertet. Die Korrelation zwischen der circRNA- und mRNA-Expression in den Zelllinien wurde mittels Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt. Die statistische Signifikanz bei mehreren Gruppen wie in dem Knockdown Experiment wurde mittels Zweiweg Varianzanalyse (*two-way ANOVA*) ermittelt. Bei nur 2 Gruppen wie in dem Überexpression- und *Rescue*-Experiment wurde ein ungepaarter zweiseitiger T-Test verwendet. Zu der Darstellung der Proliferation über die Zeit wurden die Fläche unter der Kurve (*Area under the curve, AUC*) berechnet. Es wurden immer mindestens drei biologische Replikate mit je drei technischen Replikaten angefertigt. Ein P-Wert von unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. In den Graphen 7 c, 8 a-g, 10 a+c, 11a-c+g-h, 13 b-f, 14 a-h werden der Mittelwert und die Spannweite dargestellt.

3 Ergebnisse

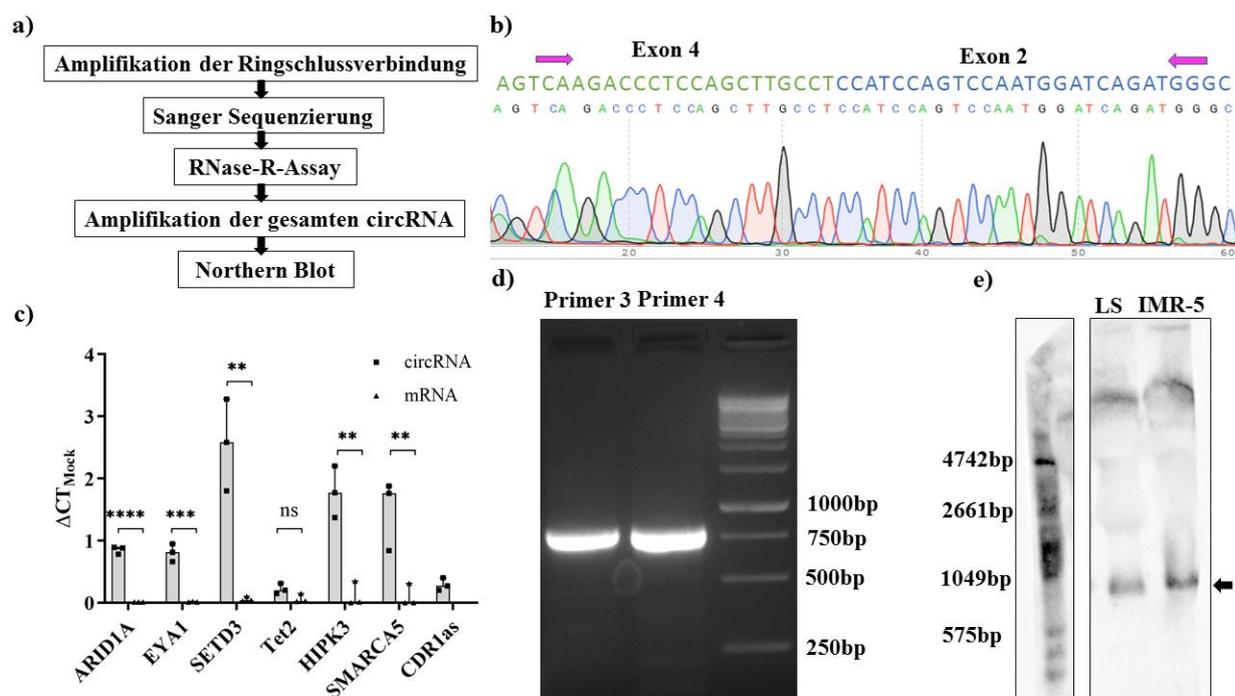
3.1 Zirkuläre RNAs werden im Neuroblastom exprimiert

Durch die Sequenzierung von 104 primären Neuroblastom-Proben, konnte die AG Schulte 5171 potenzielle circRNAs identifizieren. Diese circRNA Kandidaten wurden anschließend im Labor validiert. Für die Identifizierung von circRNAs durch *Total RNA Next Generation* Sequenzierung wurde aufgrund der kurzen Leselänge die für die circRNAs charakteristischen Ringschlussverbindungen genutzt. Das Illumina Sequenzierungs-Protokoll sieht eine cDNA Synthese aus der Tumor RNA vor. Hierbei kann es theoretisch zu sogenanntem *Template Switching* kommen, wobei die reverse Transkriptase zwischen zwei RNA Fragmenten in räumlicher Nähe wechselt. Die daraus resultierenden Verbindungen können zu falsch positiven Ergebnissen führen (87). Um sicher zu sein, dass es sich bei den identifizierten Ringschlussverbindungen wirklich um die der circRNAs handelt, wurde eine mehrstufige Validierung durchgeführt (siehe Grafik 7a). Es wurden sieben potenzielle circRNAs ausgewählt, welche eine hohe Expression in den primären Tumoren zeigten. Drei der ausgewählten circRNA Kandidaten (CDR1as, circHIPK3, circSMARCA5) waren zum Zeitpunkt der Validierung bereits in Publikationen beschrieben und dienten als Positivkontrollen. Die circRNAs circSETD3, circARID1A, circEYA1 und circTet2 waren zu Zeitpunkt der Validierung noch durch keine anderen Arbeitsgruppen validiert worden.

Tabelle 2: Validierung potenzieller circRNAs. Die durch RNA-Sequenzierung detektierten circRNA-Sequenzen wurde mit den annotierten Sequenzen auf circBASE verglichen (34). Zur Vereinheitlichung sind die circBASE IDs dargestellt. In grün dargestellte circRNA-Kandidaten dienten während der Validierung als Positivkontrollen, während rot dargestellte Kandidaten erstmals validiert werden sollten.

Name	circBASE ID	Koordinaten	Länge	Referenz
CDR1as	hsa_circ_0001946	chrX(-):140783175-140784659	1485bp	(48)
circHIPK3	hsa_circ_0000284	chr11(+):33286413-33287511	1099bp	(88)
circSMARCA5	hsa_circ_0001445	chr4(+):143543509-143543972	269bp	(89)
circSETD3	hsa_circ_0000567	chr14(-):99458279-99465813	683bp	(90)
circARID1A	hsa_circ_0008494	chr1(+):26729651-26732792	783bp	Schulte
circEYA1	hsa_circ_0084764	chr8(-):71299047-71334174	702bp	Schulte
circTet2	hsa_circ_0070562	chr4(+):105233897-105237351	3455bp	Schulte

Im ersten Validierungsschritt wurden die Ringschlussverbindungen der circRNA Kandidaten aus RNA der Zelllinie IMR-5/75 amplifiziert. Hierzu wurden divergente Primern designt, welche spezifisch für die jeweiligen circRNAs waren. Sanger Sequenzierung der PCR Produkte bestätigte die korrekte Amplifikation der Ringschlussverbindungen aller sieben circRNA Kandidaten (siehe beispielhaft Grafik 7b). Um die Kandidaten auf ihre zirkuläre Struktur zu überprüfen, wurde ein RNase-R-Assay durchgeführt. RNase-R degradiert lineare RNA, während zirkuläre RNAs weitestgehend stabil bleiben (31). Fünf der Kandidaten zeigten eine signifikant höhere Stabilität als ihre zugehörigen mRNAs (siehe Grafik 7c). Lediglich circTet2 erwies sich nicht als signifikant stabiler im Vergleich zu der mRNA. Für CDR1as ließ sich kein Vergleich zu einer mRNA erstellen, da das Wirtsgen von CDR1as zum Zeitpunkt der Validierung noch nicht bekannt war. Die CDR1as Expression sank nach RNase-R Behandlung auf ca. 30% im Vergleich zur Kontrolle und erwies sich somit nicht als RNase-R resistent.

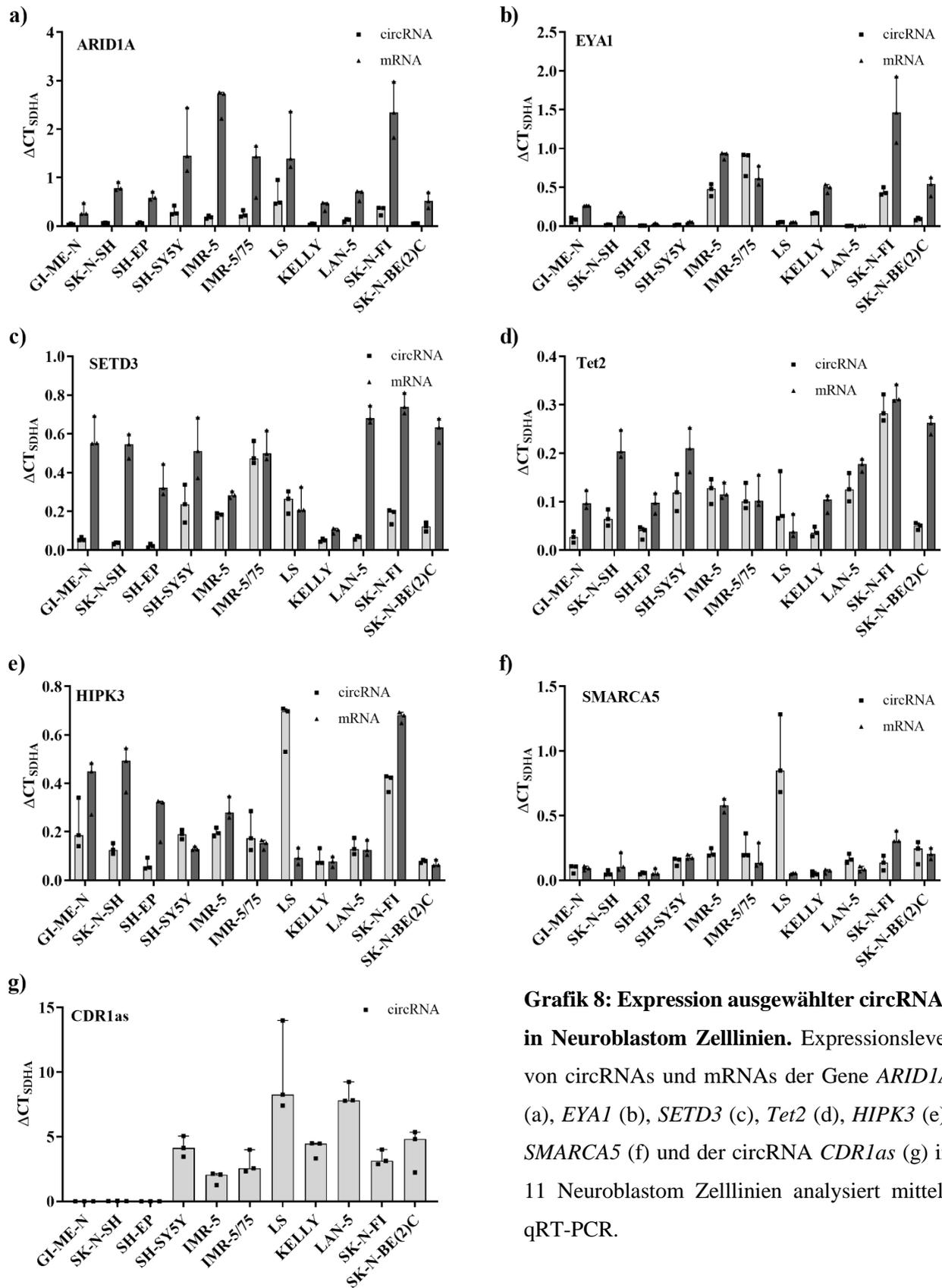


Grafik 7: Validierung potenzieller circRNAs bestätigt die Expression zirkulärer RNAs im Neuroblastom. (a) Validierungsstrategie von durch RNA-Sequenzierung identifizierten circRNA-Kandidaten. (b) Sanger Sequenzierung von circARID1A (c) RNase-R-Assay (d) Amplifikation der gesamten circARID1A mit zwei verschiedenen Primer-Paaren bestätigte die angenommene Größe von 783 Nukleotiden. (e) Detektion von circARID1A durch Northern Blot in den Neuroblastom Zelllinien LS und IMR-5.

Diese Studie konzentriert sich auf circARID1A. Daher wurden weitere Validierungsschritte durchgeführt, um sich der zirkulären Identität wirklich sicher sein zu können und zu eruieren, ob die circRNA aus allen angenommenen drei Exons besteht oder zudem Introns enthält bzw. Exons hinausgespleißt wurden. Dies beinhaltete die Amplifikation der gesamten circARID1A durch zwei verschiedene divergente Primer-Paare, wodurch die angenommen Größe von 783 Nukleotiden bestätigt werden konnte (siehe Grafik 7d). CircARID1A besteht somit aus den Exons 2-4 des *ARID1A* Gens. Alle Introns werden herausgespleißt. Zum direkten Nachweis von circARID1A wurde ein Northern Blot mit Sonden, die die Ringschlussverbindung binden, durchgeführt. Hierdurch konnte circARID1A direkt in den Neuroblastom Zelllinien LS und IMR-5 nachgewiesen werden (siehe Grafik 7e).

3.2 Zirkuläre RNAs werden in Neuroblastom Zellen meist niedriger exprimiert als ihre zugehörigen mRNAs

Für die ausgewählten circRNA Kandidaten und ihre jeweiligen mRNAs wurden Expressionsanalysen mittels qRT-PCR in 11 verschiedenen Neuroblastom Zelllinien durchgeführt. Diese besaßen allesamt verschiedene genetische Hintergründe, welche den Methoden entnommen werden können. Die circRNA Kandidaten konnten in dem Großteil der Zelllinien nachgewiesen werden, welches weitere *in-vitro* Untersuchungen ermöglichen würde. CDR1as wurde nicht in GI-MEN, SH-N-SH und SH-EP exprimiert. Für die anderen circRNA Kandidaten ließ sich kein Zusammenhang zwischen molekularen Eigenschaften der Zelllinien und der Expressionslevel erkennen. Es zeigte sich, dass die circRNAs meist niedriger als die jeweilige mRNA exprimiert waren. Die Zelllinie LS bildete hier eine Ausnahme. Alle circRNAs außer circARID1A zeigten in LS höhere Expressionen der zirkulären Isoform im Vergleich zur mRNA. Die Expressionslevel der circRNA wurden mit denen der zugehörigen mRNA verglichen und der Korrelationsindex (Pearson-Korrelation) bestimmt. Für *ARID1A* zeigte sich eine signifikante Korrelation von circRNA und mRNA ($R^2 = 0,4$; $P = 0,038$), ebenso für *EYAI* ($R^2 = 0,5$; $P = 0,016$). Die anderen getesteten circRNAs zeigten keine Korrelation zu ihrer mRNA.



Grafik 8: Expression ausgewählter circRNAs in Neuroblastom Zelllinien. Expressionslevel von circRNAs und mRNAs der Gene *ARID1A* (a), *EYA1* (b), *SETD3* (c), *Tet2* (d), *HIPK3* (e), *SMARCA5* (f) und der circRNA *CDR1as* (g) in 11 Neuroblastom Zelllinien analysiert mittels qRT-PCR.

3.3 Das Tumorsuppressorgen ARID1A bildet eine zirkuläre RNA mit Lokalisation im Zytoplasma

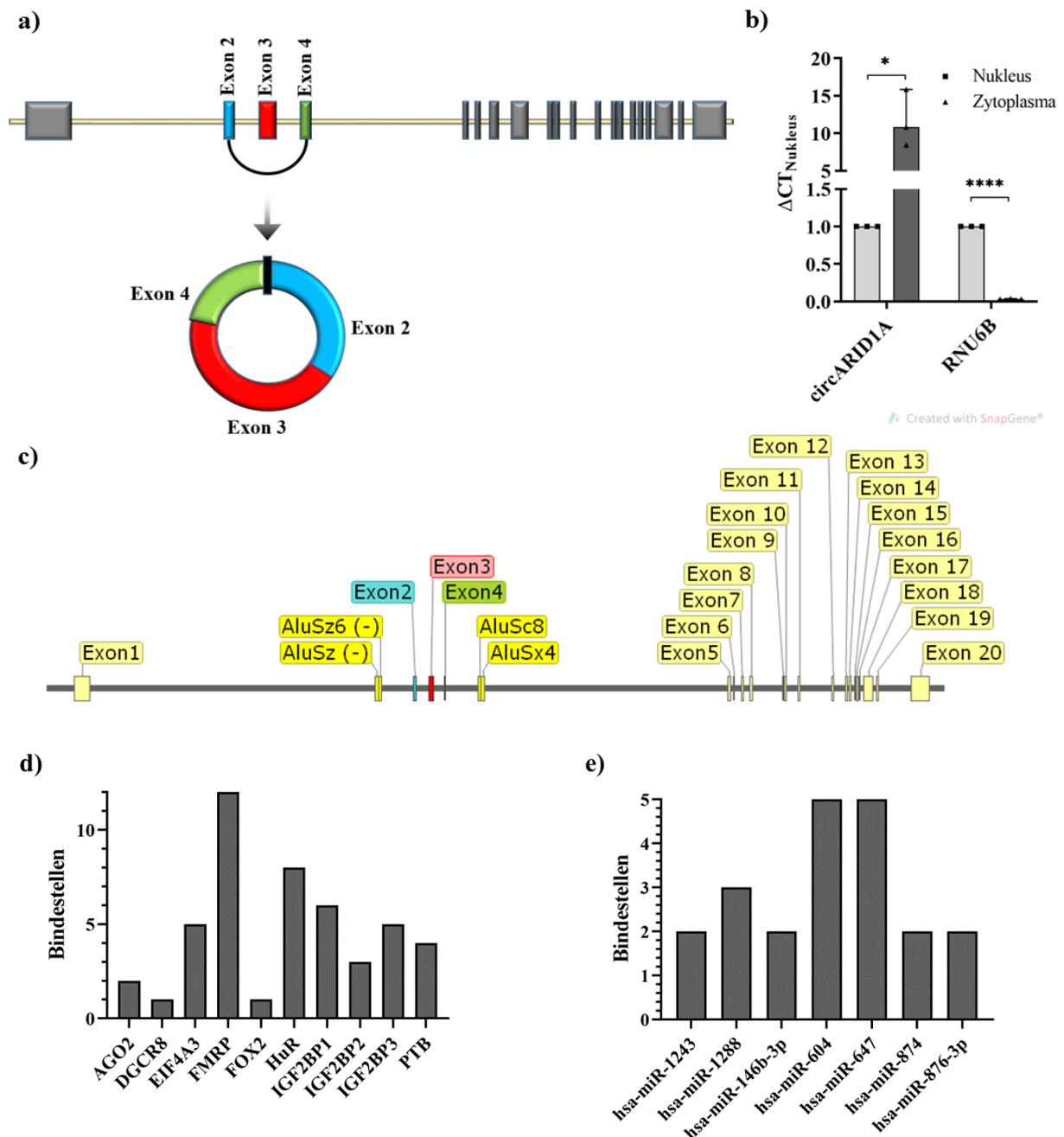
Die zirkuläre RNA circARID1A ist eine bis jetzt unbeschriebene zirkuläre RNA, die im Neuroblastom eine besonders hohe Expression zeigt. Sie befand sich im Vergleich von primären Neuroblastomen und anderen Tumorentitäten unter den Neuroblastom-spezifischen circRNAs. Das *ARID1A* Protein für welches das Wirtsgen kodiert, wurde in einer Vielzahl von Tumorentitäten wie auch dem Neuroblastom als Tumorsuppressor beschrieben (91).

Die Exone 2-4 des *ARID1A* Gens, aus welchen circARID1A gebildet wird, werden von langen Introns flankiert (siehe Grafik 9c). Intron 1 umfasst 32.110 bp und Intron 4 28.123 bp. Innerhalb dieser Introns konnten wir zudem komplementäre *Alu-Repeats* identifizieren. AluSz(-), welches 303bp lang ist, zeigte eine Komplementarität von 84% zu AluSx4, welches 298bp umfasst. Direkt an diese Alu-Sequenzen angrenzend fanden sich weitere *Alu-Repeats*. Alu Sz (-), welches 314 bp umfasst, zeigte eine Komplementarität von 78 % zu Alu Sc8, welches 301bp umfasst.

Da die Lokalisation einer circRNA in der Zelle bereits Hinweise auf ihre Funktionsweise geben kann, wurde eine Zellfraktionierung der Neuroblastom Zelllinie IMR-5 vorgenommen und die isolierte RNA anschließend durch qRT-PCR analysiert. Die korrekte Separation wurde durch die Bestimmung von *RNU6B* bestätigt. Dieses ist Teil der small nuclear RNA U6, welches als Teil des Spleißosoms nur im Nukleus vorkommt und im Neuroblastom stabil exprimiert wird (92). Für circARID1A zeigt sich eine signifikant höhere Expression im Zytoplasma (circARID1A im Nukleus: Median = 1, circARID1A im Zytoplasma: Median = 10,83; P = 0,008; n = 3). Dies deutet auf eine Lokalisation von circARID1A im Zytoplasma hin (siehe Grafik 9b).

Wir nutzten das *Webtool* circInteractome (93), um mögliche Bindepartner von circARID1A zu identifizieren. Es zeigten sich Bindemotive für zehn verschiedene RNA Bindeproteine, wobei die Gruppe der *Insulin like growth factor 2 mRNA-binding proteins* (IGF2BP 1-3) mit insgesamt 14 die meisten potenziellen Bindestellen in der circRNA aufwies, gefolgt *FMRP* (*Fragile X Mental Retardation Protein*) mit zwölf und von *HuR* (*human antigen R*) mit acht Bindestellen. Auch in den flankierenden Introns zeigten sich mehrere Motive für RNA Bindeproteine, so wurden für das RBP *EIF4A3* (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A3*) zehn potenzielle Bindestellen identifiziert, für *FUS* (*FUS RNA Binding Protein*) zwei und für *IGF2BP1* und *IGF2BP3* je eine Bindestelle. Es konnten potenzielle Bindestellen für 28 verschiedene miRNAs identifiziert

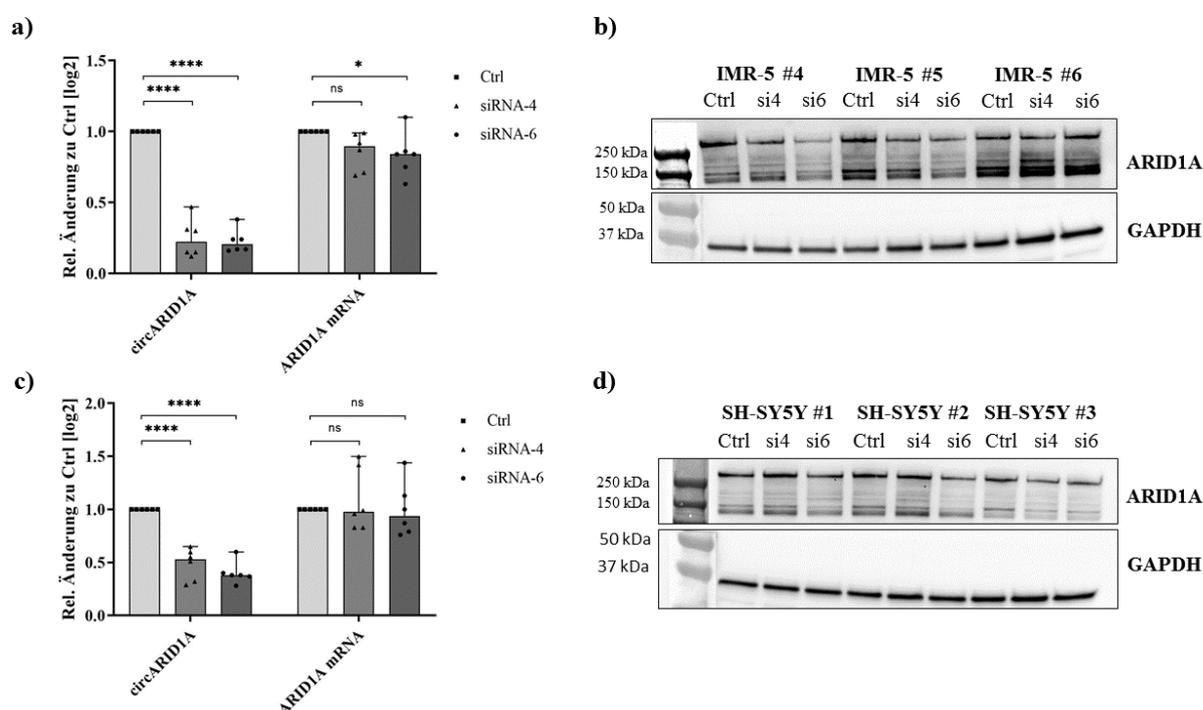
werden, wobei nur sieben miRNAs zwei oder mehr Bindestellen besaßen. Für die miRNAs hsa-miR-604 und hsa-miR-647 zeigten sich mit je fünf die meisten potenziellen Bindestellen.



Grafik 9: circARID1A. (a) Das *ARID1A* Gen besteht aus 20 Exons. Exon 2-4 bilden die zirkuläre RNA circARID1A. (b) Expressionsanalyse von circARID1A nach Zellfraktionierung mittels qRT-PCR (c) Die Exons, welche circARID1A bilden, werden von besonders langen Introns flankiert, welche komplementäre *Alu-Repeats* enthalten. (d) RBPs mit potenziellen Bindestellen in circARID1A (e) microRNAs mit zwei oder mehr potenziellen Bindestellen in circARID1A

3.4 Knockdown von circARID1A induziert Apoptose und Differenzierung in Neuroblastom Zelllinien

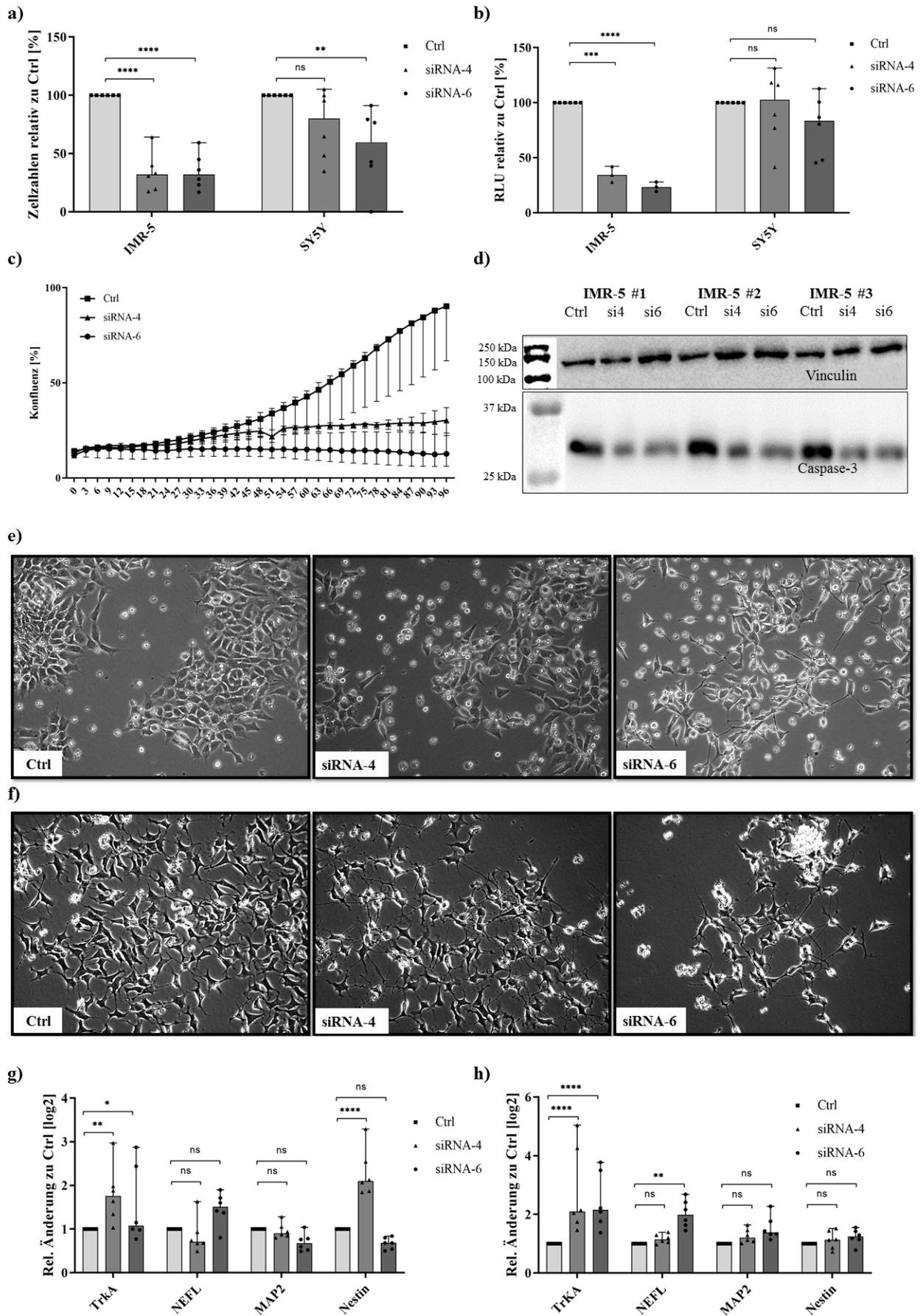
Für die funktionellen Charakterisierung von circARID1A, wurde ein *Knockdown* mit siRNAs, welche sich spezifisch gegen die Ringschlussverbindung von circARID1A richteten, durchgeführt. Es wurden jeweils zwei verschiedene siRNAs verwendet, um eine höhere Spezifität zu erreichen (siRNA-4 und siRNA-6). Als Kontrolle diente eine *scrambled* siRNA, welche keine bekannten humanen Nukleinsäuren bindet. Für die Versuche wurden die Zelllinien IMR-5 und SH-SY5Y verwendet. Durch die Transfektion mit siRNA-4 zeigte sich in der Zelllinie IMR-5 eine signifikante Reduktion von circARID1A auf 22,5 % und durch siRNA-6 auf 20,5 % im Vergleich zur Kontrolle (siehe Grafik 10a; Relative Änderung im Vergleich zu Ctrl [log2]: circARID1A_{siRNA-4}: Median = 0,225; P < 0,0001; n = 6; circARID1A_{siRNA-6}: Median = 0,205; P < 0,0001; n = 6). In SH-SY5Y erwies sich der *Knockdown* als weniger effektiv, so wurde durch siRNA-4 eine Reduktion auf 53 % und durch siRNA-6 eine Reduktion auf 38 % erreicht (siehe Grafik 10c; Relative Änderung im Vergleich zu Ctrl [log2]: circARID1A_{siRNA-4}: Median = 0,53; P < 0,0001; n = 6; circARID1A_{siRNA-6}: Median = 0,38; P < 0,0001 n = 6).



Grafik 10: Validierung des circARID1A Knockdowns. CircARID1A Knockdown durch zwei siRNAs in IMR-5 (a) Expressionsanalyse mittels qRT-PCR. (b) ARID1A Protein Detektion im Western Blot. CircARID1A Knockdown durch zwei siRNAs in SH-SY5Y (c) Expressionsanalyse mittels qRT-PCR. (d) ARID1A Protein Detektion im Western Blot.

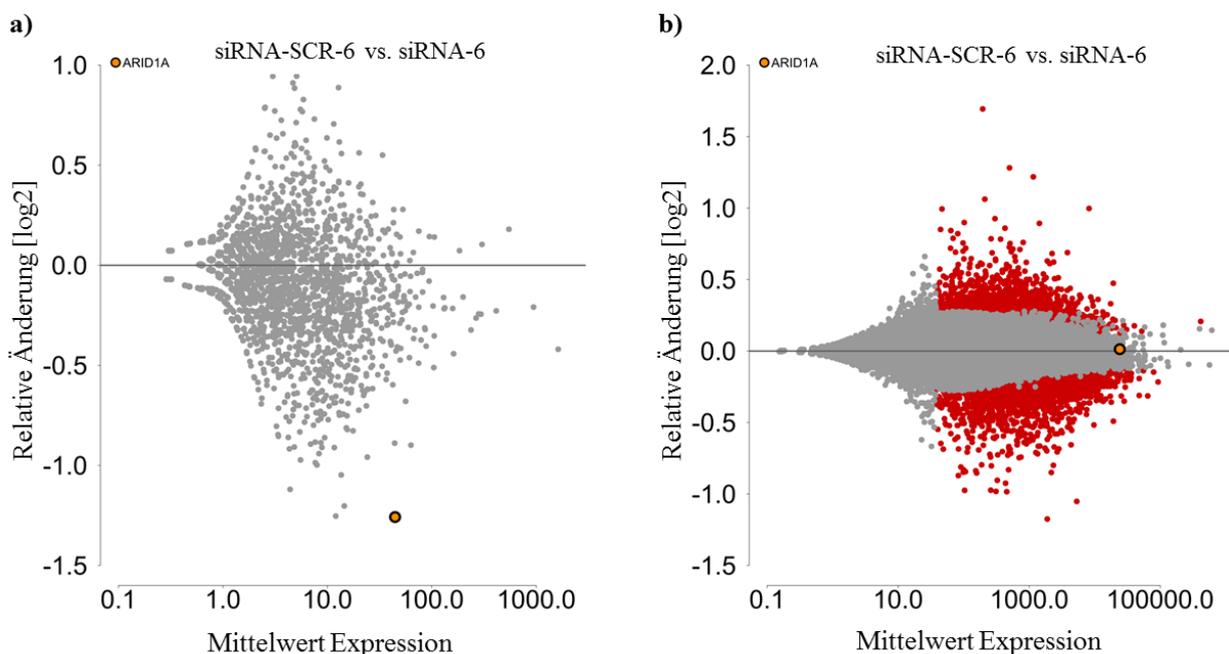
In beiden Zelllinien wurde die Expression der mRNA nicht oder nur gering beeinflusst (siehe Grafik 10a+c). Um auch einen Einfluss des Knockdowns auf das *ARID1A* Protein zu untersuchen, wurde ein *Western Blot* durchgeführt. Hier zeigte sich in der Zelllinie IMR-5 eine leichte Reduktion des Proteins in zwei von drei Replikaten und in der Zelllinie SH-SY5Y eine leichte Reduktion durch die Transfektion mit siRNA-6 (siehe Grafik 10b+d).

In der Zelllinie IMR-5 hatte die siRNA-Transfektion durch siRNA-4 und siRNA-6 in beiden Fällen eine Reduktion der Zellzahlen auf 31,9 % im Vergleich zur Kontrolle zu Folge (siehe Grafik 11a; Zellzahlen relativ zur Ctrl [%]: IMR-5_{siRNA-4}: Median = 31,9; P < 0,0001; n = 6; IMR-5_{siRNA-6}: Median = 31,9; P < 0,0001; n = 6). Eine parallel durchgeführte Untersuchung der Zellviabilität stützte diese Ergebnisse zusätzlich. So sank diese nach Transfektion durch siRNA-4 auf 34,3 % und nach Transfektion durch siRNA-6 auf 23,24 % (siehe Grafik 11b; RLU relativ zur Ctrl [%]: IMR-5_{siRNA-4}: Median = 34,29; P = 0,0002 n = 3; IMR-5_{siRNA-6}: Median = 23,34; P < 0,0001 n = 3). Durch das *IncuCyte®S3 Live Cell System* war es uns möglich die Proliferation der Zellen durch Konfluenz-Messungen über die Zeit zu bestimmen. Kulturen, welche mit siRNA-4 oder -6 transfiziert wurden zeigten deutlich reduzierte Proliferation (siehe Grafik 11c). So betrug die *Area under the curve* (AUC) bei mit siRNA-4 transfizierten Zellen nur 63 % und bei mit siRNA-6 behandelten Zellen nur 41 % der AUC der Kontrolle (*Area under the curve* (Konfluenz [%] / Zeit [h]): IMR-5_{Ctrl}: 1162; n = 3; IMR-5_{siRNA-4}: 734,8; n = 3; IMR-5_{siRNA-6}: 481,1; n = 3). Insgesamt zeigten sich nicht nur weniger Zellen, in den mit siRNA 4 oder -6 transfizierten IMR-5 Kulturen zeigten sich auch deutlich mehr abgerundete Zellen (siehe Grafik 11e). Im *Western Blot* nahm die Abundanz von Caspase-3 deutlich ab, was auf eine Spaltung im Rahmen von apoptotischer Aktivität hinweist (siehe Grafik 11d). In der Zelllinie SH-SY5Y zeigte sich der Effekt auf die Zellzahlen geringer. In den mit siRNA-4 transfizierten Kulturen zeigte sich eine Reduktion auf 80,15 % (siRNA-4) bzw. 59,69 % (siRNA-6) im Vergleich zur Kontrolle (siehe Grafik 11a; Zellzahlen relativ zur Ctrl [%]: SH-SY5Y_{siRNA-4}: Median = 80,15; P = 0,078 n = 6; SH-SY5Y_{siRNA-6}: Median = 59,69; P = 0,0014 n = 6). Die Zellviabilität änderte sich nicht signifikant (siehe Grafik 11b). Die Zellen bildeten vermehrt Ausläufer und Zell-Zell-Kontakte aus, was auf eine Differenzierung der Zellen hinweist (siehe Grafik 11f). Wir bestimmten daraufhin in beiden Zelllinien die Marker *TrkA*, *NEFL* und *MAP2*, welche auf eine neurale Differenzierung hinweisen (94-96). Zusätzlich wurde der neurale Stammzellmarker *Nestin* bestimmt (97). *TrkA* zeigte in beiden Zelllinien einen signifikanten Anstieg. Die anderen bestimmten Marker zeigten keine eindeutigen Veränderungen.



Grafik 11: Knockdown von circARID1A induziert Apoptose und Differenzierung in Neuroblastom Zelllinien. (a) Zellzahlen nach *Knockdown* in IMR-5 und SH-SY5Y relativ zur Kontrolle (b) Viabilitäts-Assay von IMR-5 und SH-SY5Y Kulturen (c) Proliferation von IMR-5 Zellen (Konfluenz [%] / Zeit [h]) (d) Western Blot von Caspase-3 in IMR-5 Zellen. (e) Fotos von IMR-5 Zellen in 20-facher Vergrößerung, aufgenommen vier Tage nach Transfektion. (f) Fotos von SH-SY5Y Zellen in 20-facher Vergrößerung, aufgenommen 4 Tage nach Transfektion. (g) Differenzierungsmarker *TrkA*, *NEFL* und *MAP2* und der neuronale Stammzellmarker *Nestin* in IMR-5 Zellen und (h) in SH-SY5Y Zellen

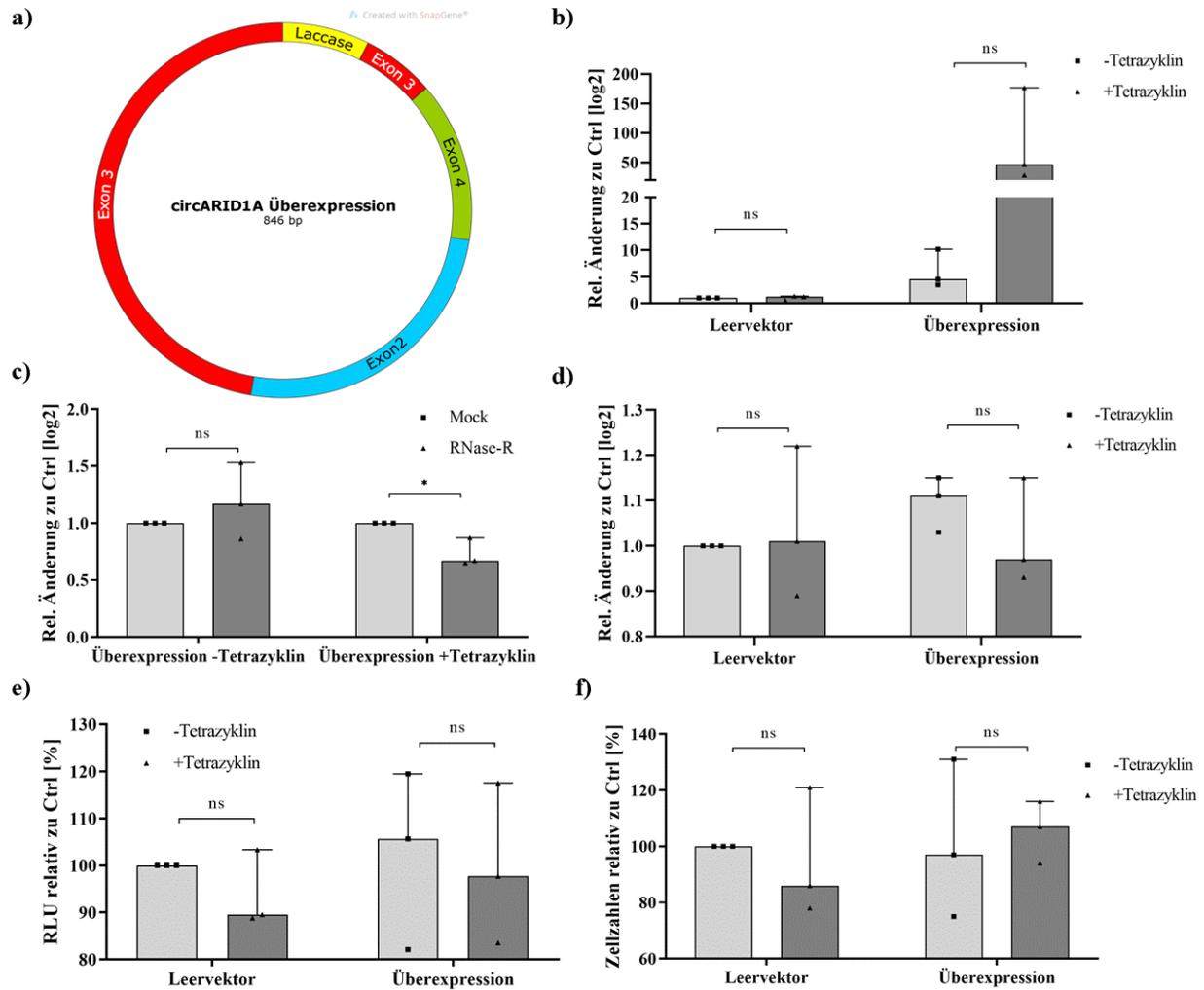
Wir führten eine *Total RNA* Sequenzierung von IMR-5 Zellen durch, welche mit siRNA-6 transfiziert wurden, da sich dieser *Knockdown* in Vorversuchen als am effektivsten erwies (siehe Grafik 11a). Als Kontrolle diente eine C911 *scrambled* siRNA (siRNA-SCR-6), bei die Basen 9-11 durch ihre komplementären Basen getauscht wurden. Dies soll eine spezifische Bindung an die Ziel-RNA verhindert und Off-Targets weiterhin herunterregulieren, sodass diese demaskiert werden (83). Morphologisch zeigten sich mit siRNA-SCR-6 transfizierte Zellen im Vergleich zu den mit siRNA-6 transfizierten Zellen unauffällig. Unter den circRNAs zeigte sich nach *Knockdown* nur circARID1A signifikant differenziell exprimiert (siehe Grafik 12a), während die Expression der *ARID1A* mRNA nicht beeinflusst wurde. Der *Knockdown* hatte einen Einfluss auf die globale mRNA Expression, so zeigten 1579 Gene eine signifikant höhere Expression und 2110 eine signifikant niedrigere Expression nach circARID1A *Knockdown* (siehe Grafik 12b).



Grafik 12: Total RNA Sequenzierungen der Zelllinie IMR-5 nach circARID1A Knockdown (a) Differenzielle Expression von circRNAs, circARID1A in orange (b) Differenzielle Expression von mRNAs, *ARID1A* in orange

3.5 Überexpression von circARID1A in SH-EP zeigt keinen messbaren Effekt

Nachdem der *Knockdown* von circARID1A zu vermehrten Zelltod und zu Differenzierung in Neuroblastomzellen führte, sollte untersucht werden, was für einen Einfluss eine Überexpression auf Neuroblastomzellen hat. Hierfür wurden SH-EP Zellen, welche in den Expressionsanalysen eine niedrige endogene circARID1A Expression zeigten, verwendet. Wir nutzten das *Plasmid pcDNA3.1(+)* *Laccase2 MCS Exon Vector* von der Arbeitsgruppe von Jeremy Wilusz und fügten die circARID1A Sequenz in diesen ein. Der Vektor beinhaltet die flankierenden Introns des *Laccase2*-Gens aus *Drosophila melanogaster*. Kamer *et al.* zeigten 2015, dass diese die Zirkularisierung von dazwischen geschalteten Genen durch lange komplementäre Basensequenzen begünstigen (86). Dieses Konstrukt klonierten wir wiederum in ein Tetrazyklin-induzierbares Expressions-System. Wir sequenzierten das durch Aktivierung gebildete Produkt und es zeigte sich eine Insertion von 63 bp des *Laccase* Introns mit unbekanntem Einfluss auf die Eigenschaften der circRNA. Die einzigartige Ringschlussverbindung von circARID1A zwischen Exon 4 und Exon 2 blieb erhalten (siehe Grafik 13a). Als Kontrolle klonierten wir SH-EP-Zellen, die einen Leervektor mit der *Laccase*-Sequenz, jedoch ohne circARID1A Sequenz enthielten. Das Aktivieren durch Hinzufügen von Tetrazyklin hatte in diesen Zellen keinen Einfluss auf die circARID1A Expression (siehe Grafik 13b). SH-EP Zellen, die den Überexpressionsvektor enthielten, zeigten bereits ohne Aktivierung eine 4,5-fach höhere Expression von circARID1A im Vergleich zur Kontrolle. Nach Aktivierung mit Tetrazyklin verzehnfachte sich diese (siehe Grafik 13b; Relative Änderung [log₂] von circARID1A zu Leervektor_{-Tetrazyklin}: Überexpression_{-Tetrazyklin}: Median = 4,45; Überexpression_{+Tetrazyklin}: Median = 46,53; P = 0,17; n = 3), sodass die Überexpression als erfolgreich gewertet wurde. Um zu überprüfen, ob das gebildete Produkt wirklich zirkulär ist, wurde ein RNase-R Assay durchgeführt. Durch die Behandlung sank das circARID1A Level, um ca. 30 %, sodass davon ausgegangen werden kann, dass mindestens 70% der gebildeten Produkte zirkulär sind (siehe Grafik 13c; Relative Änderung [log₂] von circARID1A zu Leervektor_{Mock}: Leervektor_{RNase-R}: Median = 1,17; P = 0,39; n = 3; Relative Änderung [log₂] von circARID1A zu Leervektor_{Mock}: Überexpression_{RNase-R}: Median = 0,67; P = 0,018; n = 3). Die Überexpression hatte keinen Einfluss auf die ARID1A mRNA Expression (siehe Grafik 12d). Die Zell-Viabilität (siehe Grafik 13e) und die Zellzahlen (siehe Grafik 13e) änderten sich durch die Überexpression nicht.

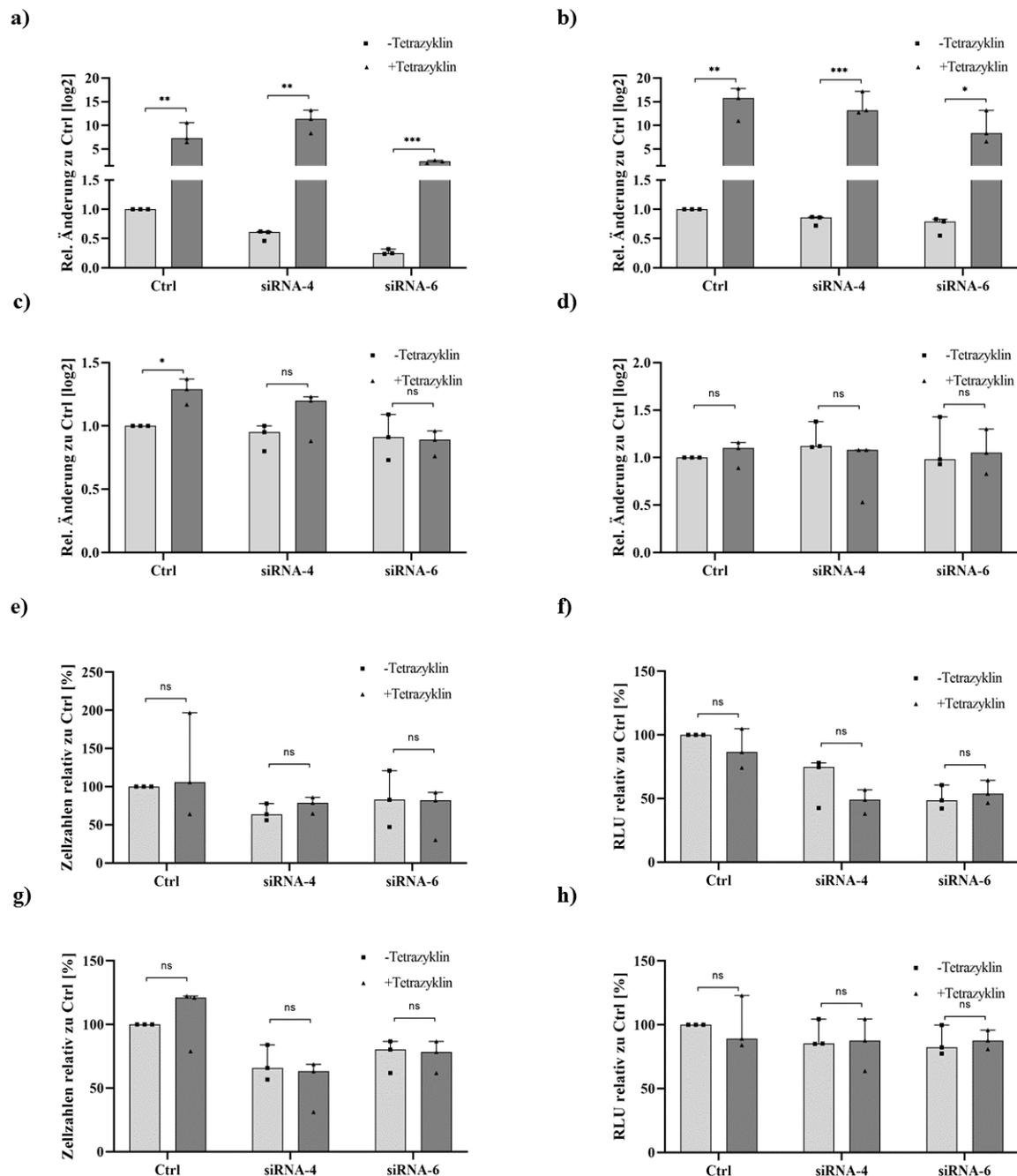


Grafik 13: Überexpression von circARID1A in Neuroblastom Zelllinien. (a) Schematische Darstellung der circRNA, welche durch den Überexpressionsvektor gebildet wurde (b) Expressionsanalyse von *circARID1A* in SH-EP Zellen, die den Leervektor oder den Überexpressionsvektor enthielten (c) RNase-R Assay nach Überexpression von *circARID1A* (d) Expression der *ARID1A* mRNA nach Überexpression. (e) Zellviabilität und (f) Zellzahlen nach Überexpression

3.6 Wiederherstellung der *circARID1A* Expression macht den Phänotyp nach *Knockdown* nicht rückgängig

Wir führten ein *Rescue*-Experiment durch, um die *circARID1A* Expression nach *Knockdown* wiederherzustellen. Hierzu wurde der Überexpressionsvektor in SH-SY5Y und IMR-5 Zellen kloniert, welche bereits den *Tet-Repressor* enthielten. Ein Tag nach *Knockdown* wurde die Überexpression durch Zugabe von Tetrazyklin induziert. Hierdurch konnte die *circARID1A* Expression in beiden Zelllinien auch nach *Knockdown* mindestens auf das Level der

Ausgangsexpression angehoben werden (siehe Grafik 14a+b). Die ARID1A mRNA wurde weder durch den *Knockdown*, noch durch die Überexpression signifikant beeinflusst (siehe Grafik 14c+d). Der durch den *Knockdown* hervorgerufene Effekt konnte durch die Überexpression nicht rückgängig gemacht werden. So änderten sich die Zellzahlen und die Zell Viabilität weder in IMR-5 (siehe Grafik 13 e + f) noch in SH-SY5Y (siehe Grafik 13 g +h) durch die Überexpression.



Grafik 14: Rescue Experiment. (a) CircARID1A Expression in IMR-5 und (b) SH-SY5Y Zellen. (c) ARID1A mRNA Expression in IMR-5 und (d) SH-SY5Y Zellen. (e) Zellzahlen und (f) Zellviabilität in IMR-5 Kulturen (g) Zellzahlen und (h) Zellviabilität in SH-SY5Y Kulturen

4 Diskussion

4.1 Zirkuläre RNA werden unabhängig von ihren zugehörigen mRNAs exprimiert

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer neuen Klasse von nicht-kodierenden RNAs, den circRNAs. Diese gerieten erst vor einigen Jahren in das Interesse der Wissenschaftler, als Salzmann *et. al.* circRNAs in verschiedenen Zelllinien als die vorherrschende RNA Isoform hunderter Gene identifizierten (31). Im Laufe der vergangenen Jahre zeigte sich, dass zirkuläre RNAs besonders hoch in neuronalen Geweben exprimiert werden und eine Rolle in der neuronalen Differenzierung spielen (44). Da sich das Neuroblastom, der häufigste extrakranielle Tumor des Kindesalters, aus Vorläuferzellen des peripheren Nervensystems bildet und eine Fehlprogrammierung dieser Zellen angenommen werden kann, stellt sich die Frage, welche Rolle circRNAs in der Biogenese des Neuroblastoms spielen (2). In einer Vielzahl anderer Tumorentitäten wurden bereits circRNAs beschrieben, welche als Onkogen oder Tumorsuppressor Einfluss auf die Tumorbilogie ausüben (56).

Zu Beginn dieser Arbeit existierten keine Publikationen zu circRNAs im Neuroblastom. Im Laufe der vergangenen 2 Jahre wurden verschiedene circRNAs beschrieben, welche alle als potenzielle Onkogene im Neuroblastom fungieren. Insgesamt sind mit circAGO2 (51), circCUX1 (59, 98, 99), circDGKB (60), circKIF2a (61) und circPDE5A (62) fünf circRNAs im Neuroblastom validiert und funktionell charakterisiert worden. Die Expressionsanalysen erfolgten mittels qRT-PCR oder Microarray in Neuroblastom-Proben oder -Zelllinien. Auch ein durch *Next Generation Sequenzierung* generierter Datensatz von Neuroblastom Zelllinien wurde auf circRNAs untersucht (100). Eine Analyse der globalen circRNA Expression in primären Neuroblastomen erfolgte jedoch nicht.

Mitarbeiter der AG Schulte wählten einen unvoreingenommenen Ansatz der Expressionsanalyse von circRNAs in Neuroblastomen. So wurde der Datensatz, auf dem diese Studie aufbaut, durch die Total RNA Sequenzierung von 104 primären Neuroblastom Proben aller Risikogruppen angefertigt. Hierdurch können sowohl circRNAs als auch mRNAs nachgewiesen werden.

Dieser Datensatz konnte durch ein mehrstufiges Validierungsprotokoll *in vitro* validiert werden. Die Ringschlussverbindungen aller sieben circRNA Kandidaten inklusive der Positivkontrollen konnten erfolgreich amplifiziert und durch Sanger Sequenzierung bestätigt werden. Fünf von sechs Kandidaten zeigten sich gegenüber RNaseR signifikant resistenter als ihre jeweiligen mRNAs. Es

kann somit mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Kandidaten um circRNAs handelt, denn RNase-R degradiert nur lineare RNAs (31). Für CDR1as ließ sich kein Vergleich mit einer mRNA herstellen, da das Wirtsgen zum Zeitpunkt der Validierung nicht bekannt war. Später wurde beschrieben, dass CDR1as aus der lncRNA LINC00632 entsteht, welche von dem reversen Strang des *CDR1*-Gens (*Cerebellar Degeneration-Related protein 1*) transkribiert wird (47). Ein Vergleich der mit RNase-R behandelten Zellen mit der Kontrolle zeigte jedoch eine Abnahme der CDR1as Expression auf ca. 30%. Es wurde bereits durch andere Arbeitsgruppen beschrieben, dass CDR1as nicht vollständig RNase-R resistent ist (101). Auch circTet2 erwies sich nicht als RNase-R resistent. Ob es sich bei Tet2 um eine circRNA handelt, bleibt daher vorerst unklar. Dies müsste durch weitere Experimente wie beispielsweise ein Actinomycin D Assay weiter untersucht werden. Actinomycin D hemmt die Transkription von circRNAs und mRNAs. Durch ihre zirkuläre Struktur und den fehlenden Poly-A-Schwanz besitzen circRNAs eine höhere Halbwertszeit als mRNAs und sind daher nach Actinomycin Behandlung der Zellen in höheren Konzentrationen als die mRNAs vorhanden (36). Da das Hauptinteresse dieser Studie jedoch nicht auf circTet2 liegt, wurde vorerst auf diese Experimente verzichtet. Bei der bioinformatischen Analyse der RNA Sequenzierungsdatensätze kann es selten aus verschiedenen Gründen zu der fehlerhaften Identifizierung von circRNA Kandidaten kommen, denn für die Identifikation von circRNAs in den Sequenzierungsdatensätzen kann nur die Ringschlussverbindungen genutzt werden (87). So kann es durch *Template Switching* während der reversen Transkription zu der Verbindung zweier Exone in nicht-kanonischer Reihenfolge kommen. Endogen kann es durch Exon Duplikationen auf DNA-Ebene oder Transsplicing zu Duplikation von Exon Sequenzen kommen, was ebenfalls zu falsch positiven Ergebnissen bei der Identifikation von circRNAs führen würde. Dies ist in der humanen Zelle jedoch selten. Eine ausführliche *in vitro* Validierung der Kandidaten ist somit unerlässlich.

Wir führten Expressionsanalysen aller sieben circRNA Kandidaten in 11 Neuroblastom Zelllinien durch, die allesamt verschiedene molekulare Eigenschaften besaßen. Drei der ausgewählten circRNA Kandidaten (CDR1as, circHIPK3, circSMARCA5) waren zum Zeitpunkt der Validierung bereits in Publikationen beschrieben und dienten als Positivkontrollen. CircSETD3 wurde 2019 zudem als Tumorsuppressor im hepatozellulären Karzinom identifiziert (90). Es ließ sich keine klare Korrelation von circRNAs mit den genetischen Signaturen wie einer MYCN Amplifikation oder einer TP53 Mutation identifizieren. Für den Großteil der circRNAs fiel keine Korrelation zu ihren mRNAs auf. Dieses Phänomen ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und deutet auf einen separaten Regulationsmechanismus von circRNA und mRNA

Spleißen hin (39, 40). Die circRNAs circARID1A und circEYA zeigten eine positive Korrelation zu ihren mRNAs, welche sich mit den Sequenzierungsdaten des Tumordatensets deckten. Dies könnte auf eine gegenseitige Regulation von circ- und mRNA hinweisen, wie es beispielsweise bei circCUX1 der Fall ist (59). Trotz der Korrelation kann eine circRNA jedoch auch Funktionen ausüben, die unabhängig von denen der mRNA sind, wie die vorliegende Studie im Fall von circARID1A suggeriert. In den Expressionsanalysen fiel auf, dass CDR1as nicht in den Zelllinien GI-ME-N, SH-EP und SK-N-SH exprimiert wurde. In einer Publikation von van Groningen *et. al.* werden die Zelllinien GI-ME-N und SH-EP als mesenchymal beschrieben, während SK-N-SH den adrenergen Zelllinien zugeordnet wird. (102). Es fällt jedoch auf, dass die Gensignaturen aller drei Zelllinien nah beieinander liegen. Van Groningen *et. al.* postulieren, dass diese Gensignaturen durch zwei verschiedene Super-Enhancer beeinflusst werden und, dass mesenchymale Zellen eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zeigen. Sollte ein Zusammenhang zwischen einem der Super-Enhancern bestehen oder sich zeigen, dass CDR1as nur oder vor allem in adrenerge Zellen exprimiert ist, könnte CDR1as als Tumormarker genutzt werden, welcher mit einer guten Prognose assoziiert wäre. Als eine der am besten untersuchten circRNAs überhaupt wurde CDR1as in zahlreichen Tumorentitäten untersucht und sowohl tumorsuppressive also auch tumorfördernde Eigenschaften abhängig von der Tumorentität festgestellt (103). CDR1as übt jedoch nicht nur gewebsspezifische Funktionen aus, sondern wird auch gewebsspezifisch exprimiert. So zeigten Kristensen *et.al.*, dass CDR1as nicht in Kolonkarzinom Zellen exprimiert wird, sondern v.a. im Tumorstroma (104). Anders sehe dies für embryonale und neuroendokrine Tumoren aus, die CDR1as exprimieren. Zu CDR1as im Neuroblastom liegen bis jetzt keine Veröffentlichungen vor, sodass eine systematische Untersuchung inklusive des Tumorstromas in einer weiteren Studie erfolgen sollte. Weiterhin auffällig war in den Expressionsanalysen, dass in der Zelllinie LS der Großteil der circRNAs höher exprimiert wurde als ihre mRNAs. Die Zelllinie LS zeichnet sich durch einen hyperdiploiden Karyotyp mit einer Trisomie des Chromosoms 17, einer Deletion des Chromosoms 12, einem Derivatchromosom 5 und zwei Markerchromosomen aus, welche Amplifikationen des MYCN Onkogens enthalten [49,XX,-12,+der5,+17,+mar1,+mar2] (76). Ein Zusammenhang der molekularen Eigenschaften und der hohen circRNA Expression im Vergleich zu der mRNA Expression der getesteten Gene ist möglich, konnte bis jetzt jedoch nicht hergestellt werden. Um einen Zusammenhang herstellen zu können wäre eine *Total RNA* Sequenzierung der Zelllinie sinnvoll.

4.2 Das Tumorsuppressorgen ARID1A bildet eine circRNA mit Lokalisation im Zytoplasma

Das Tumorsuppressorgen ARID1A ist Teil des SWI/SNF-Komplex, der in 20% aller Tumorentitäten mutiert ist (65). Das ARID1A Gen bildet neben der linearen mRNA auch eine zirkuläre RNA, kurz circARID1A (circBASE ID: hsa_circ_0008494). Verglichen mit anderen Tumorentitäten und neuralem Gewebe wird circARID1A besonders hoch im Neuroblastom exprimiert.

In einer Studie von Sausen et al, in der 71 Neuroblastome untersucht wurden, zeigten sich in 4 Fällen (6%) Punktmutationen im *ARID1A* Gen (66). Die Lokalisationen der Mutationen wurden mit der Lokalisation der circRNA im Gen abgeglichen, wobei die Mutationen in allen Fällen außerhalb der für die circRNA kodierenden Exons lagen. Auch eine Mutation, die einen *Frameshift* zu Folge hatte, beeinflusste die Synthese der circRNA nicht, da sie sich abseits der Exon 2-4 in 3' Richtung befand.

Die Exons 2-4, welche die circRNA bilden, werden von langen Introns flankiert. Die Länge von humanen Introns ist stark variabel. Mehr als die Hälfte sind jedoch zwischen 101bp und 2kb lang (105). Die Introns, welche Exon 2 und 4 des ARID1A Gens flankieren sind deutlich länger. So umfasst Intron 1 32.110 bp und Intron 4 28.123 bp. Innerhalb dieser Introns konnten wir zudem komplementäre *Alu-Repeats* identifizieren. Es wurde bereits durch andere Studien beschrieben, dass lange flankierende Introns zu der Biogenese von circRNAs beitragen indem komplementäre Sequenzen zu der Bildung von Dimeren führen und die Exons in Räumliche Nähe gebracht werden (31). Die Entdeckungen der langen Introns 1 und 4 des ARID1A Gens mit ihren komplementären Sequenzen deuten auf denselben Mechanismus beim Spleißen von circARID1A hin. Des Weiteren konnten wir in den flankierenden Introns Bindestellen für RBPs identifizieren. Für EIF4A3 identifizierten wir zehn potenzielle Bindestellen. Die Expression der circRNAs circMMP2, circSEPT9, circASPA1 werden durch EIF4A3 gefördert, sodass auch ein Einfluss auf die Bildung von circARID1A wahrscheinlich ist (106-108). Eine globale Regulierung von circRNA Bildung ist für das RBP FUS beschrieben (109). Dieses besitzt zwei Bindestellen in den flankierenden Introns von circARID1A.

Durch Zellfraktionierung und qRT-PCR identifizierten wir circARID1A im Zytoplasma. Dies lässt bereits eine erste Eingrenzung eines möglichen Wirkmechanismus von circARID1A zu. So ist die Bindung an miRNAs oder RBPs wie für andere circRNAs beschrieben möglich. MiRNAs können

mRNAs binden und deren Transkription und Translation inhibieren (22). Die Bindung einer circRNA an eine miRNA hätte typischerweise eine Inhibierung dieser zu Folge, resultierend in einer höheren Transkription der Ziel-mRNA. Der Bekannteste miRNA-Sponge ist CDR1as, welche mehr als 70 Bindestellen für die miRNA miR-7 besitzt (101). Die circRNA circARID1A besitzt mit maximal 5 Bindestellen je miRNA deutlich weniger Bindestellen, sodass eine Funktion als miRNA-Sponge unwahrscheinlich scheint. Es gibt jedoch zahlreiche Veröffentlichungen, in denen circRNAs als miRNA *Sponges* beschrieben werden, die nur eine Bindestelle für die jeweilige miRNA besitzen (110). Als Beispiel sind die circRNAs circDGKB (60), circKIF2A (61) und circPDE5A (62) zu nennen, welche im Neuroblastom überexprimiert sind. Ein Großteil dieser Ergebnisse entstand jedoch durch Überexpression der jeweiligen circRNA. Hierdurch kommt es zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen circRNA und miRNA. Eine circRNA, welche normalerweise durch eine geringe Menge nicht als suffizienter *Sponge* wirken kann, wird plötzlich zu einem. Nur selten wird das Mengenverhältnis von circRNA zu miRNA in einer Zelle berücksichtigt. Alle der sieben miRNAs, welche zwei oder mehr Bindestellen an circARID1A aufweisen, wurden in verschiedenen anderen Tumorentitäten mindestens als differenziell exprimiert beschrieben (111-117). Dem Großteil dieser miRNAs wird zudem tumorsuppressive Eigenschaften zugeschrieben, sodass die Inhibierung durch eine circRNA tumorfördernd wirken würde. Im Neuroblastom sind diese miRNAs bis jetzt nicht beschrieben und es stellt sich die Frage, wie hoch sie im Neuroblastom exprimiert sind und, ob sie ggf. Einfluss auf die Tumorbilogie nehmen. Die Möglichkeit, dass circARID1A als miRNA-Sponge wirkt, sollte nicht außer Acht gelassen werden, erscheint jedoch unwahrscheinlich.

Auch eine Interaktion mit RBPs ist möglich. Die meisten potenziellen Bindestellen an circARID1A besitzt laut circInteractome (93) die Gruppe der *Insulin like growth factor 2 mRNA-binding proteins* (IGF2BP 1-3) mit insgesamt 14 Bindemotiven. IGF2BPs werden v.a. im Zytoplasma exprimiert und spielen eine essenzielle Rolle in der Migration und Entwicklung von Zellen der Neuralleiste (118). Unter anderem stabilisieren sie die *MYC* Expression durch Bindung der mRNA. In gesunden Geweben außerhalb der Embryonalphase werden sie im Kontrast zu vielen Tumorgeweben niedrig bis gar nicht exprimiert. Im Neuroblastom ist die Expression von IGF2B3 mit einem besonders aggressiven, schlecht differenzierten Phänotyp und somit mit einer schlechten Prognose assoziiert (119). Eine mögliche Interaktion zwischen circARID1A und IGF2BPs sollte in weiteren Studien untersucht werden.

4.3 Knockdown von circARID1A identifiziert diese als Onkogen

Die Neuroblastom-spezifische Expression von circARID1A und die Tumor-assoziierten Bindepartner ließen die Hypothese zu, dass circARID1A eine Rolle in der Biologie des Neuroblastoms spielt. Es galt nun die Funktion von circARID1A im Neuroblastom zu entschlüsseln. Wir führten einen siRNA-basierten *Knockdown* von circARID1A in den Neuroblastom Zelllinien SH-SY5Y und IMR-5 durch. Der *Knockdown* war mit einer Reduktion der circARID1A Expression in IMR-5 um ca. 80% und in SH-SY5Y um ca. 55% erfolgreich ohne die mRNA-Expression und das ARID1A Protein Level signifikant zu beeinflussen.

In der MYCN-amplifizierten Zelllinie IMR-5 resultierte der *Knockdown* von circARID1A in einer um 70% reduzierten Zellzahl und Zellviabilität, sowie einer deutlich abgeflachten Proliferationskurve. Im *Westernblot* zeigte sich eine Apoptose-Induktion. In SH-SY5Y nahm die Zellzahl weniger stark und nur um 20% ab. Auffälliger waren die morphologischen Hinweise auf eine Zell-Differenzierung. So bildeten SH-SY5Y Zellen nach circARID1A-*Knockdown* vermehrt Ausläufer und Zell-Zell-Kontakte aus. Der neurale Marker *TrKA* zeigte sich nach *Knockdown* erhöht, was ebenfalls einen Hinweis auf neurale Differenzierung gibt. Der *Knockdown* von circARID1A resultierte somit in Tumorsuppression. Dies lässt den Schluss zu, dass circARID1A eine tumorfördernde Funktionen ausübt.

Der *Knockdown* wurde mit zwei verschiedenen siRNAs durchgeführt, um *Off-target* Effekte, das heißt die Bindung an andere Moleküle, zu minimieren. Zudem wurde eine *scrambled* siRNA als Kontrolle verwendet. Um einen spezifischen *Knockdown* einer circRNA zu erreichen, muss sich die siRNA gegen die Ringschlussverbindung dieser richten. Eine siRNA umfasst 21 Nukleotide, sodass bei einer Überlappung der Ringschlussverbindung um mind. 7 Nukleotide nur eine Auswahl von 28 bp besteht, welche als Angriffsfläche genutzt werden kann. Dies erschwert das siRNA-Design erheblich und führt dazu, dass *Off-target* Effekte bis zum Schluss nicht ausgeschlossen werden könnten. Für die Next Generation Sequenzierung des *Knockdowns* in IMR-5 verwendeten wir als Kontrolle eine C911 *scrambled* siRNA (siRNA-SCR-6), bei der die Basen 9-11 durch ihre komplementären Basen getauscht wurden, um *Off-targets* zu demaskieren (83). Es zeigt sich ein erfolgreicher *Knockdown* von circARID1A ohne, dass die *ARID1A* mRNA beeinflusst wurde. Morphologisch zeigten sich mit siRNA-SCR-6 transfizierte Zellen im Vergleich zu den mit siRNA-6 transfizierten Zellen als unauffällig, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei dem tumorsuppressiven Effekt des circARID1A *Knockdown* nicht um einen *Off-target* Effekt handelt. Diese Studie beschäftigt sich mit der Funktion von circARID1A. Der molekulare Wirkmechanismus inklusive der 1579 heraufregulierten und 2110

herunterregulierten Gene nach *Knockdown* werden im Rahmen einer weiterführenden Studie analysiert.

Eine Möglichkeit die Spezifität des *Knockdowns* zu erhöhen wäre die Verwendung des CRISPR/Cas13d Systems (120). Lange Zeit war durch das CRISPR/Cas9 System nur die Gen Manipulation auf DNA-Ebene möglich. Konermann *et. al.* zeigten 2018, dass auch ein *Knockdown* von nicht-kodierenden und kodierenden RNAs mittels CRISPR/Cas 13d möglich ist. Dieser besäße zudem eine höhere Spezifität als der *Knockdown* mittels sh- oder siRNAs.

4.4 Die Überexpression und der *Rescue* zeigen keinen messbaren Effekt

Nach erfolgreichem *Knockdown* und den Hinweisen auf eine tumorfördernde Funktion von circARID1A, strebten wir an diese durch eine Überexpression weiter zu untersuchen. Es gelang uns die circARID1A Expression durch einen Vektor in der Zelllinie SH-EP um ca. das 40-fache zu steigern, ohne die *ARID1A* mRNA-Expression zu beeinflussen. Eine Behandlung mit RNase-R bestätigte die Zirkularität der artifiziell geschaffenen circARID1A Moleküle. Es zeigte sich jedoch eine Insertion von 63 bp des *Laccase* Introns in der geschaffenen circRNA, welches Teil des Vektors ist. Dies kann ein Grund dafür sein, dass wir nach Überexpression keine Veränderung der Zellproliferation, die Zellviabilität und der Zellmorphologie nachweisen konnten. Zwar betrifft das Insert die Ringschlussverbindung nicht, jedoch ist es vorstellbar, dass sich beispielsweise die Sekundärstruktur der circRNA ändert, sodass Bindestellen für RBPs oder miRNAs nicht mehr zugänglich sind. Bis heute ist über die Sekundärstruktur von circRNAs sehr wenig bekannt und die Strukturvorhersage gestaltet sich schwierig, da die meisten bioinformatischen Algorithmen nur auf lineare RNAs anwendbar sind (121).

Die Insertion, in der durch den Vektor geschaffenen circRNA, könnte auch Einfluss auf das *Rescue* Experiment gehabt haben. So zeigte die Induktion der Überexpression nach erfolgtem *Knockdown* keinen Einfluss auf die Zellen. Jedoch war der Phänotyp nach *Knockdown* auch in den Kontrollzellen, in denen keine Überexpression induziert wurde, weniger stark ausgeprägt als in den Vorversuchen. Dies liegt vermutlich daran, dass Zellen, die den Überexpressionsvektor enthielten, bereits ohne Aktivierung eine 4,5-fach höhere Expression von circARID1A im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Eine andere Möglichkeit ein *Rescue* Experiment durchzuführen wäre es die Bindestellen für die siRNAs durch CRISPR/Cas13d zu mutieren, um die Bindung möglicher *Off-Targets* zu demaskieren. Dies sollte in weiteren Studien fokussiert werden.

4.5 Die Rolle von circARID1A im Muskel und in Autismus-Spektrum-Störungen

Im Laufe dieser Studie erschienen zwei Veröffentlichungen, die sich ebenfalls mit der zirkulären Isoform des ARID1A Gens beschäftigen. Jia Liu et. al. publizierten 2020 ihre Forschungsergebnisse über circARID1A im murinen Skelettmuskel (122). Die murine circARID1A entsteht wie auch die humane aus den Exonen 2-4 des ARID1A Gens. Sie besitzt 3 Basenpaare weniger als die humane Form. Die Basen von circARID1A in den beiden Spezies decken sich zu 94 %. Jia Liu et. al. identifizierten circARID1A durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) als zytoplasmatische circRNA und stützen somit unsere Ergebnisse durch eine weitere Methode. Die murine circARID1A sei im Gehirn und im Skelettmuskel höher exprimiert als ihre mRNA. Dies sehen wir für humanes Hirngewebe nicht. Auch die Ergebnisse zu den Funktionen der murinen circARID1A decken sich nicht mit den unseren. So inhibiere circARID1A die Proliferation und fördere die Differenzierung in murinen Myoblasten. Dies geschehe durch die Bindung und Inhibierung von miR-6368, welche eine Bindestelle an circARID1A besitzt. Die Expressionslevel von circARID1A und miR-6368 wurden nicht in ein Verhältnis gesetzt, sodass unklar bleibt, ob circARID1A in Konzentrationen in der Zelle vorliegt, die ein erfolgreiches Sponging von miR-6368 ermöglicht. Auch in vivo fördere circARID1A die Differenzierung und somit die Muskelregeneration. Vergleicht man also die Ergebnisse unserer Studie mit der von Jia Liu et. al. stellt sich die Frage, ob circARID1A gewebsspezifisch agiert und in verschiedenen Spezies verschiedene Funktionen ausübt.

Zwei Monate später publizierten Yen-Ju Chen et. al. über die Rolle von circRNAs in Autismus-Spektrum-Störungen (123). Die Studie konzentrierte sich auf circRNA-miRNA-mRNA Netzwerke, welche in humanen post-mortem Hirngeweben untersucht wurden. Unter den im Vergleich zur gesunden Kontrolle hochregulierten circRNAs fand sich circARID1A. Die in vitro Validierung erfolgte in sechs verschiedenen neuronalen Zelllinien, u.a. auch in der Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y. Die Lokalisation von circARID1A wurde durch qRT-PCR im Zytoplasma bestimmt. Untersuchungen in Gehirngeweben verschiedener Vertebraten zeigte eine hohe Konservierung von circARID1A, was evolutionär gesehen auf eine wichtige Funktion hinweist. Zudem sei circARID1A im Gehirn höher exprimiert als ihre zugehörige mRNA. Dies deckt sich mit den Daten von Jia Liu et. al., während unsere Analysen anderes suggerieren. Yen-Ju Chen et. al. beschreiben, dass miR-204-3p sieben Bindestellen auf circARID1A besitzt und so durch diese

inhibiert werde. Dies habe eine höhere Expression von Risikogenen der Autismus-Spektrum-Störungen zu Folge. Im Weiteren ließ man humane neuronale Stammzellen differenzieren, wodurch die circARID1A Expression und die Expression der Risikogene stieg. Rybak-Wolf et al. ließen 2015 SH-SY5Y Zellen durch Retinsäure differenzieren (44). Hier zeigte sich keine Induktion der circARID1A Expression.

Die Beobachtung der gesteigerten circARID1A Expression während der neuralen Differenzierung steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, die eine vermehrte Zell-Differenzierung durch circARID1A Knockdown zeigten. Für die beschriebenen miRNAs miR-6368 und miR-204-3p zeigten sich in unserer Analyse mit circInteractome keine Bindestellen auf circARID1A. Eine unabhängige Untersuchung ist erforderlich.

4.6 Limitationen und Ausblick

Diese Arbeit basiert auf einer erstmaligen globalen Charakterisierung von circRNAs in Neuroblastom-Patientenproben mittels *Total RNA* Sequenzierung. Dieser Datensatz wurde erfolgreich validiert und kann somit als Grundlage für weitere Studien zum Thema circRNAs im Neuroblastom dienen.

Das Tumorsuppressorgen *ARID1A* bildet neben einer linearen mRNA auch eine circRNA, kurz circARD1A. Diese ist im Neuroblastom im Vergleich zu anderen Tumorentitäten und Hirngeweben hochreguliert. Wir identifizierten circARID1A im Zytoplasma. Durchgeführte *Knockdown* Experimente in zwei verschiedenen Neuroblastom Zelllinien suggerieren eine tumorfördernde Funktion von circARID1A. Mit siRNA behandelte Zellen zeigten eine verringerte Proliferation, vermehrt Apoptose und Hinweise auf neurale Differenzierung. Um diese Ergebnisse zu untermauern, wären weitere Folgeexperimente sinnvoll, da die Überexpression von circARID1A und auch ein *Rescue* Experiment kein Effekt auf die Neuroblastom Zellen zeigten. Als Limitation dieser Studie ist somit der *Knockdown* mittels siRNAs als solches zu sehen, da *Off-target* Effekte bis zum Schluss nicht vollständig ausgeschlossen werden können. Eine weitere Möglichkeit eines *Knockdowns* wäre daher die Verwendung des CRSPR/Cas13d Systems. Die zum Teil widersprüchlichen Befunde über die circARID1A Expression während der Zelldifferenzierung durch andere Arbeitsgruppen sollte unabhängig untersucht werden. So würde es sich anbieten Neuroblastom-Zellen durch Retinsäure differenzieren zu lassen und die circARID1A Expressionslevel zu verschiedenen Zeitpunkten zu bestimmen. Zwar erfolgte ein ähnliches

Experiment bereits durch Rybak-Wolf *et al.*, jedoch nur in der Zelllinie SH-SY5Y und die Zellen wurden nur nach Tag 4 und Tag 8 nach Retinsäure Behandlung auf Expressionslevels von circRNAs untersucht (44).

Unsere Experimente erfolgten *in vitro* in Zelllinien Modellen. Ein Tumor ist jedoch mehr als die Summe seiner Zellen. So können innerhalb eines Tumors verschiedene Tumorzellen mit diversen molekularen Signaturen nachgewiesen werden (124). Hinzu kommen nicht kanzeröse Stromazellen und die tumoreigene Gefäßversorgung. Dementsprechend muss die Rolle von circARID1A in komplexeren Systemen als der Zellkultur untersucht werden. Hier würde sich zunächst ein Xenograft Modell anbieten. Hier würden Neuroblastom Zellen, welche ein induzierbare *Knockdown*- oder ein induzierbares Überexpressionssystem beinhalten, Nacktmäusen subkutan injiziert werden und das Tumorverhalten über die Zeit beobachtet werden.

Sollte sich die tumorfördernden Eigenschaften von circARID1A bestätigen, so würde dies ein neues therapierbares Ziel im Neuroblastom darstellen. Um eine spezifische Therapie zu erreichen, ohne die mRNA Expression zu beeinflussen, müsste die Ringschlussverbindung als Ziel genutzt werden. In der Entwicklung von RNA Therapien wurden in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Aktuell sind zwei Dutzend RNA basierte Präparate durch die FDA zugelassen (125). Gerade während der Corona-Pandemie hat sich durch die schnelle Entwicklung von mRNA-basierten Impfstoffen das enorme Potential von RNA Therapien gezeigt. In der Entwicklung von RNA Therapeutika ergeben sich jedoch auch zahlreiche Herausforderungen. Grund dafür sind die hohe Instabilität von RNAs, die geringe Membranpermeabilität, ungewünschte Off- und On-target Effekte sowie die Stimulation des Immunsystems. Aktuell gibt es vier etablierte Therapie Formen, die diese Problematiken durch verschiedene Mechanismen adressieren und überwinden: modifizierte *Antisense Oligonucleotides* (ASOs), *N-Acetylgalactosamine-siRNA* Konjugate (GalNAc-siRNA Konjugate), *Lipid Nanoparticles* (LNPs) und *Adeno-associated Virus* (AAV) Vektoren. Bis jetzt gibt es keine zugelassenen Medikamente, die sich gegen nicht-kodierende RNAs richten, jedoch ist der Wissenschaft das enorme Potenzial dieser bewusst und einige *Anti-miRNAs* und *miRNA-Mimics* werden bereits in klinischen Studien getestet (126). In vielen Fällen regulieren ncRNA nicht nur ein Zielgen, sondern zahlreiche Zielgene ähnlicher Funktion. Dies kann einerseits zu einer hohen Wirksamkeit von RNA Therapien führen, welche sich gegen ncRNAs richten, andererseits jedoch auch vermehrt Off-target Effekte zur Folge haben. Im Falle von circARID1A sind vor allem auch unerwünschte On-target Effekte zu bedenken, da diese nicht exklusiv in Tumorzellen exprimiert wird, sondern auch im gesunden Gehirngewebe eine hohe

Expression zeigt. Tumorsuppressive circRNAs sind als potenzielle Therapeutika besonders interessant, da diese durch ihre zirkuläre Struktur sehr stabil sind.

Durch ihre hohe Stabilität sind circRNAs auch als Biomarker interessant (37). Die Korrelation zwischen der circARID1A Expression und klinischen Merkmalen wie dem Überleben wird momentan von Mitgliedern der AG Schulte untersucht. Zwischen den verschiedenen Risikogruppen ließ sich jedoch bis jetzt kein Expressionsmuster eruieren.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Funktion von circARID1A. Die Funktionsweise wird momentan durch weitere Mitglieder der AG Schulte erforscht. Dies beinhaltet neben der Analyse der differentiellen Genexpression nach circARID1A Knockdown (siehe Graphik 12) einen *Pulldown* von potenziellen Bindepartnern. Diese werden mittels Massenspektrometrie und RNA Sequenzierung analysiert. Auch die Biogenese von circARID1A ist von großem Interesse, so sollte der Einfluss von EIF4A3 und FUS auf das circARID1A Spleißen durch *Knockdown* Experimente weiter untersucht werden.

Während dieser Arbeit taten sich weitere Fragen auf. So beispielsweise, welche Rolle CDR1AS im Neuroblastom spielt und wieso die untersuchten circRNA Kandidaten besonders hoch in der Zelllinie LS exprimiert werden. Dies wird in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Zusammenfassend identifizierten wir circARID1A als Neuroblastom-spezifische circRNA, welche tumorfördernde Eigenschaften ausübt. Insgesamt leistet diese Studie einen Beitrag zum besseren Verständnis eines komplexen Netzwerkes aus kodierenden und nicht-kodierenden RNAs und dessen Rolle in der Biologie des Neuroblastoms. Sie kann als Grundlage für weitere Forschungen zu circRNAs im Neuroblastom und der damit verbundenen Identifizierung von Biomarkern und Therapiezielen dienen.

Literaturverzeichnis

1. Kaatsch P, C S. German Childhood Cancer Registry - Report 2012 (1980-2012). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz 2013.
2. Hoehner JC, Gestblom C, Hedborg F, Sandstedt B, Olsen L, Pahlman S. A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors' progress along an extra-adrenal chromaffin lineage. *Lab Invest.* 1996;75(5):659-75.
3. Furlan A, Dyachuk V, Kastriti ME, Calvo-Enrique L, Abdo H, Hadjab S, Chontorotzea T, Akkuratova N, Usoskin D, Kamenev D, Petersen J, Sunadome K, Memic F, Marklund U, Fried K, Topilko P, Lallemand F, Kharchenko PV, Ernfors P, Adameyko I. Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla. *Science.* 2017;357(6346).
4. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010;24(1):65-86.
5. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010;362(23):2202-11.
6. Meena JP, Seth R, Chakrabarty B, Gulati S, Agrawala S, Naranje P. Neuroblastoma presenting as opsoclonus-myoclonus: A series of six cases and review of literature. *J Pediatr Neurosci.* 2016;11(4):373-7.
7. Shojaei-Brosseau T, Chompret A, Abel A, de Vathaire F, Raquin MA, Brugieres L, Feunteun J, Hartmann O, Bonaiti-Pellie C. Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France. *Pediatr Blood Cancer.* 2004;42(1):99-105.
8. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, Coze C, Philip N, Frebourg T, Munnich A, Lyonnet S, Delattre O, Amiel J. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet.* 2004;74(4):761-4.
9. Raabe EH, Laudenslager M, Winter C, Wasserman N, Cole K, LaQuaglia M, Maris DJ, Mosse YP, Maris JM. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene.* 2008;27(4):469-76.
10. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, Laquaglia MJ, Sennett R, Lynch JE, Perri P, Laureys G, Speleman F, Kim C, Hou C, Hakonarson H, Torkamani A, Schork NJ, Brodeur GM, Tonini GP, Rappaport E, Devoto M, Maris JM. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature.* 2008;455(7215):930-5.

11. Schulte JH, Bachmann HS, Brockmeyer B, Depreter K, Oberthur A, Ackermann S, Kahlert Y, Pajtler K, Theissen J, Westermann F, Vandesompele J, Speleman F, Berthold F, Eggert A, Brors B, Hero B, Schramm A, Fischer M. High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(15):5082-92.
12. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature.* 1983;305(5931):245-8.
13. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science.* 1984;224(4653):1121-4.
14. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, Weiss WA. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16078.
15. Peifer M, Hertwig F, Roels F, Dreidax D, Gartlgruber M, Menon R, Kramer A, Roncaioli JL, Sand F, Heuckmann JM, Ikram F, Schmidt R, Ackermann S, Engesser A, Kahlert Y, Vogel W, Altmüller J, Nürnberg P, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Mariappan A, Heynck S, Mariotti E, Henrich KO, Gloeckner C, Bosco G, Leuschner I, Schweiger MR, Savelyeva L, Watkins SC, Shao C, Bell E, Hofer T, Achter V, Lang U, Theissen J, Volland R, Saadati M, Eggert A, de Wilde B, Berthold F, Peng Z, Zhao C, Shi L, Ortmann M, Buttner R, Perner S, Hero B, Schramm A, Schulte JH, Herrmann C, O'Sullivan RJ, Westermann F, Thomas RK, Fischer M. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature.* 2015;526(7575):700-4.
16. Maris JM, Guo C, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM. Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36(1):24-7.
17. Ladenstein R, Ambros IM, Potschger U, Amann G, Urban C, Fink FM, Schmitt K, Jones R, Slociak M, Schilling F, Ritter J, Berthold F, Gadner H, Ambros PF. Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36(1):83-92.
18. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol.* 1993;11(8):1466-77.
19. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK, Force IT.

The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):289-97.

20. Simon T, Hero B, Schulte JH, Deubzer H, Hundsdoerfer P, von Schweinitz D, Fuchs J, Schmidt M, Prasad V, Krug B, Timmermann B, Leuschner I, Fischer M, Langer T, Astrahantseff K, Berthold F, Lode H, Eggert A. 2017 GPOH Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients with Neuroblastic Tumors. *Klin Padiatr.* 2017;229(3):147-67.

21. Anastasiadou E, Jacob LS, Slack FJ. Non-coding RNA networks in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(1):5-18.

22. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.

23. Wei JS, Song YK, Durinck S, Chen QR, Cheuk AT, Tsang P, Zhang Q, Thiele CJ, Slack A, Shohet J, Khan J. The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene.* 2008;27(39):5204-13.

24. Althoff K, Schulte JH, Schramm A. Towards diagnostic application of non-coding RNAs in neuroblastoma. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(12):1307-13.

25. Mestdagh P, Bostrom AK, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P, von Stedingk K, Ghesquiere B, Schulte S, Dews M, Thomas-Tikhonenko A, Schulte JH, Zollo M, Schramm A, Gevaert K, Axelson H, Speleman F, Vandesomepele J. The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma. *Mol Cell.* 2010;40(5):762-73.

26. Pandey GK, Mitra S, Subhash S, Hertwig F, Kanduri M, Mishra K, Fransson S, Ganeshram A, Mondal T, Bandaru S, Ostensson M, Akyurek LM, Abrahamsson J, Pfeifer S, Larsson E, Shi L, Peng Z, Fischer M, Martinsson T, Hedborg F, Kogner P, Kanduri C. The risk-associated long noncoding RNA NBAT-1 controls neuroblastoma progression by regulating cell proliferation and neuronal differentiation. *Cancer Cell.* 2014;26(5):722-37.

27. Mondal T, Juvvuna PK, Kirkeby A, Mitra S, Kosalai ST, Traxler L, Hertwig F, Wernig-Zorc S, Miranda C, Deland L, Volland R, Bartenhagen C, Bartsch D, Bandaru S, Engesser A, Subhash S, Martinsson T, Caren H, Akyurek LM, Kurian L, Kanduri M, Huarte M, Kogner P, Fischer M, Kanduri C. Sense-Antisense lncRNA Pair Encoded by Locus 6p22.3 Determines Neuroblastoma Susceptibility via the USP36-CHD7-SOX9 Regulatory Axis. *Cancer Cell.* 2018;33(3):417-34 e7.

28. Liu PY, Tee AE, Milazzo G, Hannan KM, Maag J, Mondal S, Atmadibrata B, Bartonicek N, Peng H, Ho N, Mayoh C, Ciaccio R, Sun Y, Henderson MJ, Gao J, Everaert C, Hulme AJ,

-
- Wong M, Lan Q, Cheung BB, Shi L, Wang JY, Simon T, Fischer M, Zhang XD, Marshall GM, Norris MD, Haber M, Vandesompele J, Li J, Mestdagh P, Hannan RD, Dinger ME, Perini G, Liu T. The long noncoding RNA lncNB1 promotes tumorigenesis by interacting with ribosomal protein RPL35. *Nat Commun.* 2019;10(1):5026.
29. Hsu MT, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature.* 1979;280(5720):339-40.
30. Cocquerelle C, Mascrez B, Hetuin D, Bailleul B. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J.* 1993;7(1):155-60.
31. Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One.* 2012;7(2):e30733.
32. Wang PL, Bao Y, Yee MC, Barrett SP, Hogan GJ, Olsen MN, Dinneny JR, Brown PO, Salzman J. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life. *PLoS One.* 2014;9(6):e90859.
33. Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, Ebbesen KK, Hansen TB, Kjems J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet.* 2019;20(11):675-91.
34. Glazar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA.* 2014;20(11):1666-70.
35. Salzman J. Circular RNA Expression: Its Potential Regulation and Function. *Trends Genet.* 2016;32(5):309-16.
36. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA.* 2013;19(2):141-57.
37. Memczak S, Papavasileiou P, Peters O, Rajewsky N. Identification and Characterization of Circular RNAs As a New Class of Putative Biomarkers in Human Blood. *PLoS One.* 2015;10(10):e0141214.
38. Li Y, Zheng Q, Bao C, Li S, Guo W, Zhao J, Chen D, Gu J, He X, Huang S. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Res.* 2015;25(8):981-4.
39. Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003777.

40. Maass PG, Glazar P, Memczak S, Dittmar G, Hollfinger I, Schreyer L, Sauer AV, Toka O, Aiuti A, Luft FC, Rajewsky N. A map of human circular RNAs in clinically relevant tissues. *J Mol Med (Berl)*. 2017;95(11):1179-89.
41. Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*. 2014;159(1):134-47.
42. Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, Conn VM, Salmanidis M, Phillips CA, Roslan S, Schreiber AW, Gregory PA, Goodall GJ. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*. 2015;160(6):1125-34.
43. Ivanov A, Memczak S, Wyler E, Torti F, Porath HT, Orejuela MR, Piechotta M, Levanon EY, Landthaler M, Dieterich C, Rajewsky N. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell Rep*. 2015;10(2):170-7.
44. Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, Jens M, Pino N, Giusti S, Hanan M, Behm M, Bartok O, Ashwal-Fluss R, Herzog M, Schreyer L, Papavasileiou P, Ivanov A, Ohman M, Refojo D, Kadener S, Rajewsky N. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Mol Cell*. 2015;58(5):870-85.
45. Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, Evtantal N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell*. 2014;56(1):55-66.
46. Huang S, Yang B, Chen BJ, Bliim N, Ueberham U, Arendt T, Janitz M. The emerging role of circular RNAs in transcriptome regulation. *Genomics*. 2017;109(5-6):401-7.
47. Barrett SP, Parker KR, Horn C, Mata M, Salzman J. ciRS-7 exonic sequence is embedded in a long non-coding RNA locus. *PLoS Genet*. 2017;13(12):e1007114.
48. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 2013;495(7441):384-8.
49. Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, Statham AL, Clark SJ, Kjems J. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J*. 2011;30(21):4414-22.
50. Guo JU, Agarwal V, Guo H, Bartel DP. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol*. 2014;15(7):409.
51. Chen Y, Yang F, Fang E, Xiao W, Mei H, Li H, Li D, Song H, Wang J, Hong M, Wang X, Huang K, Zheng L, Tong Q. Circular RNA circAGO2 drives cancer progression through facilitating HuR-repressed functions of AGO2-miRNA complexes. *Cell Death Differ*. 2019;26(7):1346-64.

52. Abe N, Matsumoto K, Nishihara M, Nakano Y, Shibata A, Maruyama H, Shuto S, Matsuda A, Yoshida M, Ito Y, Abe H. Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells. *Sci Rep.* 2015;5:16435.
53. Zhang M, Huang N, Yang X, Luo J, Yan S, Xiao F, Chen W, Gao X, Zhao K, Zhou H, Li Z, Ming L, Xie B, Zhang N. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. *Oncogene.* 2018;37(13):1805-14.
54. Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, Zhong G, Yu B, Hu W, Dai L, Zhu P, Chang Z, Wu Q, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu H, Shan G. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(3):256-64.
55. You X, Vlatkovic I, Babic A, Will T, Epstein I, Tushev G, Akbalik G, Wang M, Glock C, Quedenau C, Wang X, Hou J, Liu H, Sun W, Sambandan S, Chen T, Schuman EM, Chen W. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat Neurosci.* 2015;18(4):603-10.
56. Bach DH, Lee SK, Sood AK. Circular RNAs in Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;16:118-29.
57. Du WW, Fang L, Yang W, Wu N, Awan FM, Yang Z, Yang BB. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. *Cell Death Differ.* 2017;24(2):357-70.
58. Zeng K, Chen X, Xu M, Liu X, Hu X, Xu T, Sun H, Pan Y, He B, Wang S. CircHIPK3 promotes colorectal cancer growth and metastasis by sponging miR-7. *Cell Death Dis.* 2018;9(4):417.
59. Li H, Yang F, Hu A, Wang X, Fang E, Chen Y, Li D, Song H, Wang J, Guo Y, Liu Y, Li H, Huang K, Zheng L, Tong Q. Therapeutic targeting of circ-CUX1/EWSR1/MAZ axis inhibits glycolysis and neuroblastoma progression. *EMBO Mol Med.* 2019;11(12):e10835.
60. Yang J, Yu L, Yan J, Xiao Y, Li W, Xiao J, Lei J, Xiang D, Zhang S, Yu X. Circular RNA DGKB Promotes the Progression of Neuroblastoma by Targeting miR-873/GLI1 Axis. *Front Oncol.* 2020;10:1104.
61. Yang Y, Pan H, Chen J, Zhang Z, Liang M, Feng X. CircKIF2A contributes to cell proliferation, migration, invasion and glycolysis in human neuroblastoma by regulating miR-129-5p/PLK4 axis. *Mol Cell Biochem.* 2021.
62. Chen Y, Lin L, Hu X, Li Q, Wu M. Silencing of circular RNA circPDE5A suppresses neuroblastoma progression by targeting the miR-362-5p/NOL4L axis. *Int J Neurosci.* 2021:1-11.

-
63. Wang X, Nagl NG, Wilsker D, Van Scoy M, Pacchione S, Yaciuk P, Dallas PB, Moran E. Two related ARID family proteins are alternative subunits of human SWI/SNF complexes. *Biochem J.* 2004;383(Pt 2):319-25.
 64. Cheung NK, Dyer MA. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(6):397-411.
 65. St Pierre R, Kadoch C. Mammalian SWI/SNF complexes in cancer: emerging therapeutic opportunities. *Curr Opin Genet Dev.* 2017;42:56-67.
 66. Sausen M, Leary RJ, Jones S, Wu J, Reynolds CP, Liu X, Blackford A, Parmigiani G, Diaz LA, Jr., Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Hogarty MD. Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat Genet.* 2013;45(1):12-7.
 67. Garcia-Lopez J, Wallace K, Otero JH, Olsen R, Wang YD, Finkelstein D, Gudenas BL, Rehg JE, Northcott P, Davidoff AM, Freeman KW. Large 1p36 Deletions Affecting Arid1a Locus Facilitate Mycn-Driven Oncogenesis in Neuroblastoma. *Cell Rep.* 2020;30(2):454-64 e5.
 68. Bui CB, Le HK, Vu DM, Truong KD, Nguyen NM, Ho MAN, Truong DQ. ARID1A-SIN3A drives retinoic acid-induced neuroblastoma differentiation by transcriptional repression of TERT. *Mol Carcinog.* 2019;58(11):1998-2007.
 69. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 1973;33(11):2643-52.
 70. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 1978;38(11 Pt 1):3751-7.
 71. Donti E, Longo L, Tonini GP, Verdona G, Melodia A, Lanino E, Cornaglia-Ferraris P. Cytogenetic and molecular study of two human neuroblastoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988;30(2):225-31.
 72. Momoi M, Kennett RH, Glick MC. A membrane glycoprotein from human neuroblastoma cells isolated with the use of a monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 1980;255(24):11914-21.
 73. Oberthuer A, Skowron M, Spitz R, Kahlert Y, Westermann F, Mehler K, Berthold F, Fischer M. Characterization of a complex genomic alteration on chromosome 2p that leads to four alternatively spliced fusion transcripts in the neuroblastoma cell lines IMR-5, IMR-5/75 and IMR-32. *Gene.* 2005;363:41-50.

-
74. Seeger RC, Danon YL, Rayner SA, Hoover F. Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody. *J Immunol.* 1982;128(2):983-9.
75. Sugimoto T, Tatsumi E, Kemshead JT, Helson L, Green AA, Minowada J. Determination of cell surface membrane antigens common to both human neuroblastoma and leukemia-lymphoma cell lines by a panel of 38 monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst.* 1984;73(1):51-7.
76. Rudolph G, Schilbach-Stuckle K, Handgretinger R, Kaiser P, Hameister H. Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS. *Hum Genet.* 1991;86(6):562-6.
77. Suzuki K, Bose P, Leong-Quong RY, Fujita DJ, Riabowol K. REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res Notes.* 2010;3:294.
78. Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Amode MR, Armean IM, Bennett R, Bhai J, Billis K, Boddu S, Cummins C, Davidson C, Dodiya KJ, Gall A, Giron CG, Gil L, Grego T, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, Kay M, Laird MR, Lavidas I, Liu Z, Loveland JE, Marugan JC, Maurel T, McMahon AC, Moore B, Morales J, Mudge JM, Nuhn M, Ogeh D, Parker A, Parton A, Patricio M, Abdul Salam AI, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Sparrow H, Stapleton E, Szuba M, Taylor K, Threadgold G, Thormann A, Vullo A, Walts B, Winterbottom A, Zadissa A, Chakiachvili M, Frankish A, Hunt SE, Kostadima M, Langridge N, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Aken BL, Yates AD, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D745-D51.
79. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
80. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W71-4.
81. Boudreau RL, Spengler RM, Hylock RH, Kusenda BJ, Davis HA, Eichmann DA, Davidson BL. siSPOTR: a tool for designing highly specific and potent siRNAs for human and mouse. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):e9.
82. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-10.
83. Buehler E, Chen YC, Martin S. C911: A bench-level control for sequence specific siRNA off-target effects. *PLoS One.* 2012;7(12):e51942.

-
84. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0034.
85. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
86. Kramer MC, Liang D, Tatomer DC, Gold B, March ZM, Cherry S, Wilusz JE. Combinatorial control of Drosophila circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins. *Genes Dev.* 2015;29(20):2168-82.
87. Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(5):453-61.
88. Zheng Q, Bao C, Guo W, Li S, Chen J, Chen B, Luo Y, Lyu D, Li Y, Shi G, Liang L, Gu J, He X, Huang S. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. *Nat Commun.* 2016;7:11215.
89. Kong Z, Wan X, Zhang Y, Zhang P, Zhang Y, Zhang X, Qi X, Wu H, Huang J, Li Y. Androgen-responsive circular RNA circSMARCA5 is up-regulated and promotes cell proliferation in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2017;493(3):1217-23.
90. Xu L, Feng X, Hao X, Wang P, Zhang Y, Zheng X, Li L, Ren S, Zhang M, Xu M. CircSETD3 (Hsa_circ_0000567) acts as a sponge for microRNA-421 inhibiting hepatocellular carcinoma growth. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):98.
91. Wu RC, Wang TL, Shih Ie M. The emerging roles of ARID1A in tumor suppression. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(6):655-64.
92. D'Haene B, Mestdagh P, Hellemans J, Vandesompele J. miRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization. *Methods Mol Biol.* 2012;822:261-72.
93. Dudekula DB, Panda AC, Grammatikakis I, De S, Abdelmohsen K, Gorospe M. CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *RNA Biol.* 2016;13(1):34-42.
94. Eggert A, Ikegaki N, Liu X, Chou TT, Lee VM, Trojanowski JQ, Brodeur GM. Molecular dissection of TrkA signal transduction pathways mediating differentiation in human neuroblastoma cells. *Oncogene.* 2000;19(16):2043-51.
95. Capasso M, Diskin S, Cimmino F, Acierno G, Totaro F, Petrosino G, Pezone L, Diamond M, McDaniel L, Hakonarson H, Iolascon A, Devoto M, Maris JM. Common genetic variants in NEFL influence gene expression and neuroblastoma risk. *Cancer Res.* 2014;74(23):6913-24.

-
96. Fischer I, Shea TB, Sapirstein VS, Kosik KS. Expression and distribution of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in neuroblastoma and primary neuronal cells. *Brain Res.* 1986;390(1):99-109.
97. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990;60(4):585-95.
98. Wang Y, Niu Q, Dai J, Shi H, Zhang J. circCUX1 promotes neuroblastoma progression and glycolysis by regulating the miR-338-3p/PHF20 axis. *Gen Physiol Biophys.* 2021;40(1):17-29.
99. Zhang X, Zhang J, Liu Q, Zhao Y, Zhang W, Yang H. Circ-CUX1 Accelerates the Progression of Neuroblastoma via miR-16-5p/DMRT2 Axis. *Neurochem Res.* 2020;45(12):2840-55.
100. Zhang L, Zhou H, Li J, Wang X, Zhang X, Shi T, Feng G. Comprehensive Characterization of Circular RNAs in Neuroblastoma Cell Lines. *Technol Cancer Res Treat.* 2020;19:1533033820957622.
101. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature.* 2013;495(7441):333-8.
102. van Groningen T, Koster J, Valentijn LJ, Zwijnenburg DA, Akogul N, Hasselt NE, Broekmans M, Haneveld F, Nowakowska NE, Bras J, van Noesel CJM, Jongejan A, van Kampen AH, Koster L, Baas F, van Dijk-Kerkhoven L, Huizer-Smit M, Lecca MC, Chan A, Lakeman A, Molenaar P, Volckmann R, Westerhout EM, Hamdi M, van Sluis PG, Ebus ME, Molenaar JJ, Tytgat GA, Westerman BA, van Nes J, Versteeg R. Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states. *Nat Genet.* 2017;49(8):1261-6.
103. Jiang C, Zeng X, Shan R, Wen W, Li J, Tan J, Li L, Wan R. The Emerging Picture of the Roles of CircRNA-CDR1as in Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:590478.
104. Kristensen LS, Ebbesen KK, Sokol M, Jakobsen T, Korsgaard U, Eriksen AC, Hansen TB, Kjems J, Hager H. Spatial expression analyses of the putative oncogene ciRS-7 in cancer reshape the microRNA sponge theory. *Nat Commun.* 2020;11(1):4551.
105. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N,

-
- Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowki J, International Human Genome Sequencing C. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
106. Zheng X, Huang M, Xing L, Yang R, Wang X, Jiang R, Zhang L, Chen J. The circRNA circSEPT9 mediated by E2F1 and EIF4A3 facilitates the carcinogenesis and development of triple-negative breast cancer. *Mol Cancer*. 2020;19(1):73.

-
107. Wei Y, Lu C, Zhou P, Zhao L, Lyu X, Yin J, Shi Z, You Y. EIF4A3-induced circular RNA ASAP1 promotes tumorigenesis and temozolomide resistance of glioblastoma via NRAS/MEK1/ERK1-2 signaling. *Neuro Oncol.* 2021;23(4):611-24.
108. Wang R, Zhang S, Chen X, Li N, Li J, Jia R, Pan Y, Liang H. EIF4A3-induced circular RNA MMP9 (circMMP9) acts as a sponge of miR-124 and promotes glioblastoma multiforme cell tumorigenesis. *Mol Cancer.* 2018;17(1):166.
109. Errichelli L, Dini Modigliani S, Laneve P, Colantoni A, Legnini I, Caputo D, Rosa A, De Santis R, Scarfo R, Peruzzi G, Lu L, Caffarelli E, Shneider NA, Morlando M, Bozzoni I. FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons. *Nat Commun.* 2017;8:14741.
110. Goodall GJ, Wickramasinghe VO. RNA in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(1):22-36.
111. Yin J, Weng C, Ma J, Chen F, Huang Y, Feng M. MicroRNA1288 promotes cell proliferation of human glioblastoma cells by repressing ubiquitin carboxylterminal hydrolase CYLD expression. *Mol Med Rep.* 2017;16(5):6764-70.
112. Wang B, Duan R, Li ZB, Wang L. Circ-RPL15/miR-146b-3p/VEGFA feedback loop is responsible for triggering proliferation and migration in glioma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(11):6204-10.
113. Trakunram K, Chaniad P, Geater SL, Keeratichananont W, Chittithavorn V, Uttayamakul S, Buya S, Raungrut P, Thongsuksai P. Serum miR-339-3p as a potential diagnostic marker for non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Med.* 2020;17(3):652-63.
114. Tang J, Xu J, Zhi Z, Wang X, Wang Y, Zhou Y, Chen R. MiR-876-3p targets KIF20A to block JAK2/STAT3 pathway in glioma. *Am J Transl Res.* 2019;11(8):4957-66.
115. Qin K, Tian G, Chen G, Zhou D, Tang K. miR-647 inhibits glioma cell proliferation, colony formation and invasion by regulating HOXA9. *J Gene Med.* 2020;22(3):e3153.
116. Liu WG, Zhuo L, Lu Y, Wang L, Ji YX, Guo Q. miR-874-3p inhibits cell migration through targeting RGS4 in osteosarcoma. *J Gene Med.* 2020;22(9):e3213.
117. Hiramoto H, Muramatsu T, Ichikawa D, Tanimoto K, Yasukawa S, Otsuji E, Inazawa J. miR-509-5p and miR-1243 increase the sensitivity to gemcitabine by inhibiting epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):4002.
118. Bell JL, Wachter K, Muhleck B, Pazaitis N, Kohn M, Lederer M, Huttelmaier S. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(15):2657-75.

-
119. Chen ST, Jeng YM, Chang CC, Chang HH, Huang MC, Juan HF, Hsu CH, Lee H, Liao YF, Lee YL, Hsu WM, Lai HS. Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression predicts unfavorable prognosis in patients with neuroblastoma. *Cancer Sci.* 2011;102(12):2191-8.
120. Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ, Oki J, Shokhirev MN, Hsu PD. Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell.* 2018;173(3):665-76 e14.
121. Hofacker IL, Stadler PF. Memory efficient folding algorithms for circular RNA secondary structures. *Bioinformatics.* 2006;22(10):1172-6.
122. Liu J, Li M, Kong L, Cao M, Zhang M, Wang Y, Song C, Fang X, Chen H, Zhang C. CircARID1A regulates mouse skeletal muscle regeneration by functioning as a sponge of miR-6368. *FASEB J.* 2021;35(2):e21324.
123. Chen YJ, Chen CY, Mai TL, Chuang CF, Chen YC, Gupta SK, Yen L, Wang YD, Chuang TJ. Genome-wide, integrative analysis of circular RNA dysregulation and the corresponding circular RNA-microRNA-mRNA regulatory axes in autism. *Genome Res.* 2020;30(3):375-91.
124. Chicard M, Boyault S, Colmet Daage L, Richer W, Gentien D, Pierron G, Lapouble E, Bellini A, Clement N, Iacono I, Brejon S, Carrere M, Reyes C, Hocking T, Bernard V, Peuchmaur M, Corradini N, Faure-Contier C, Coze C, Plantaz D, Defachelles AS, Thebaud E, Gambart M, Millot F, Valteau-Couanet D, Michon J, Puisieux A, Delattre O, Combaret V, Schleiermacher G. Genomic Copy Number Profiling Using Circulating Free Tumor DNA Highlights Heterogeneity in Neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(22):5564-73.
125. Kulkarni JA, Witzigmann D, Thomson SB, Chen S, Leavitt BR, Cullis PR, van der Meel R. The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nat Nanotechnol.* 2021;16(6):630-43.
126. Winkle M, El-Daly SM, Fabbri M, Calin GA. Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(8):629-51.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Clara Danßmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Knockdown der zirkulären RNA circARID1A induziert Differenzierung und Apoptose in Neuroblastom Zelllinien. (Knockdown of the circular RNA circARID1A induces Differentiation and Apoptosis in Neuroblastoma Cell Lines.) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Clara Danßmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Klironomos F, Danssmann C, Naderi J, Winkler A, Luz U, Hundsdoerfer P, Eggert A, Toedling J, Hertwig F, Schulte JH, Fuchs S. **Circular RNAs contribute to Neuroblastoma pathogenesis.** Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019; 2019 Mar 29-Apr 3; Atlanta (GA), USA. AACR; Cancer Research 2019;79(13 Suppl):Abstract nr 1820.

Beitrag im Einzelnen: Es handelt sich um einen *Abstract* eines Posters, das im Rahmen des *American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019 (AACR)* von Dr. med. Steffen Fuchs präsentiert wurde. Es wurden die Graphiken 7, 8a, 10a und 11 aus dieser Monografie präsentiert.

Publikation 2: Danssmann C, Toedling J, Klironomos F, Winkler A, Hertwig F, Eggert A, Schulte JH, Fuchs S. **Circular RNAs in Neuroblastoma.** *31th Annual Meeting of the Kind-Philipp-Stiftung for pediatric oncologic Research.* June 6-9, 2018, Wilsede. *Klin Padiatr* 2018; 230(03): 169.

Beitrag im Einzelnen: Es handelt sich um einen *Abstract* eines Vortrags, der bei dem *31th Annual Meeting of the Kind-Philipp-Stiftung for pediatric oncologic Research 2018* durch mich präsentiert wurde. Es wurden die Graphiken 7 und 8a aus dieser Monografie präsentiert.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Kongressbeiträge: Vorträge

Symposium “From Lab to Life” Childhood Cancer Research Initiatives (CCRI 2018), October 18 – 20, 2018 in Vienna, Austria.

Knockdown of circARID1A inhibits cell proliferation and drives differentiation in neuroblastoma.

C. Danßmann¹, F. Klironomos¹, J. Toedling^{1,3}, A. Winkler¹, U. Luz¹, F. Hertwig^{1,3}, A. Eggert^{1,2,3}, J.H. Schulte^{1,2,3*}, S. Fuchs^{1,2,3*}

1 Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2 Berlin Institute of Health (BIH), 3 German Cancer Consortium (DKTK), Berlin; * Authors contributed equally.

XXXI. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch onkologische Forschung in Wilsede vom 6. – 9. Juni 2018

Circular RNAs in Neuroblastoma

Danßmann, C¹, Toedling, J^{1,3,4}, Klironomos, F¹, Winkler, A¹, Hertwig, F^{1,3,4}, Eggert, A^{1,2,3,4}, Schulte JH^{1,2,3,4*}, Fuchs, S^{1,2,3,4}

*1 Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2 Berlin Institute of Health (BIH), 3 German Cancer Consortium (DKTK), Berlin, 4 German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg; * Authors contributed equally.

31th Annual Meeting of the Kind-Philipp- Stiftung for pediatric oncologic Research. June 6-9, 2018, Wilsede. Klin Padiatr 2018; 230(03): 169.

Non-coding RNA and Epigenetic Regulation in Immune Cells – 4th Workshop, April 12-13, 2018 Berlin

Circular RNAs in Neuroblastoma

Danßmann, C^{1*}, Fuchs, S^{1,2,3,4*}, Toedling, J^{1,3,4}, Winkler, A¹, Klironomos F¹, McGeary, A¹, Hertwig F^{1,3,4}, Eggert A^{1,2,3,4}, Schulte JH^{1,2,3,4}

1 Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, 2 Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, 3 German Cancer Consortium (DKTK), Berlin, 4 German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg; * Authors contributed equally.

Kongressbeiträge: Posterpräsentationen und Flashtalks

e:Med Meeting on Systems Medicine 2018

Circular RNAs contribute to the pathogenesis of neuroblastoma

C. Danßmann (1), F. Klironomos (1), J. Toedling (1,3), A. Winkler (1), U. Luz (1), F. Hertwig (1,3), A. Eggert (1,2,3), J.H. Schulte (1, 2, 3)*, S. Fuchs (1, 2, 3)*

1) Charité - Universitätsmedizin Berlin, (2) Berlin Institute of Health (BIH), (3) German Cancer Consortium (DKTK), Berlin; * Authors contributed equally.

American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019

Circular RNAs contribute to Neuroblastoma pathogenesis.

Klironomos F, Danssmann C, Naderi J, Winkler A, Luz U, Hundsdoerfer P, Eggert A, Toedling J, Hertwig F, Schulte JH, Fuchs S.

Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019; 2019 Mar 29-Apr 3; Atlanta (GA), USA. AACR; Cancer Research 2019;79(13 Suppl):Abstract nr 1820.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Kollegen, meinen Freunden und meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung und Rückhalt diese Forschungsarbeit nicht möglich gewesen wäre. Zunächst danke ich Prof. Dr. med. Johannes H. Schulte dafür, dass er mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gegeben hat Teil dieses spannenden Projekts zu sein. Durch die regelmäßigen Lab Meetings und fruchtbare Diskussionen konnte ich meinen wissenschaftlichen Horizont erweitern. Ich möchte mich ebenfalls für die Unterstützung bei der Teilnahme an Kongressen bedanken, die bei weitem nicht selbstverständlich ist. Auch bei der Berliner Krebsgesellschaft e.V. möchte ich mich bedanken, die mich durch ein Promotionsstipendium unterstützt hat. Mein größter Dank gilt Dr. med. Steffen Fuchs meinem Mentor und Freund. Er hat mich in die onkologische Forschung eingeführt und mich während meiner Doktorarbeit mit größtem Engagement unterstützt. Oft hat er mir mehr zugetraut als ich mir selbst und mich dazu ermutigt meine Komfortzone zu verlassen. Auch wenn das zu viel Aufregung vor Kongressvorträgen geführt hat, möchte ich mich herzlichst dafür bedanken, denn nur so konnte ich als Wissenschaftlerin wachsen. Steffen hatte immer ein offenes Ohr und Zeit, um gemeinsame Lösungen zu finden. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer wünschen können. Das gesamte Team der AG Schulte und auch der anderen Arbeitsgruppen der pädiatrisch onkologischen Forschungsgruppen war immer bereit mich bei experimentellen Fragen zu unterstützen. Als besondere Hilfe erwies sich Annika Winkler, die als Seele des Labors stets Ansprechpartnerin und eine riesige Unterstützung für mich war. Sie lehrte mich viele Methoden wie z.B. die Klonierung und Western Blot und baute mich auf, wenn mich Experimente zur Verzweiflung brachten. Auch meinen Freunden und Kommilitonen gilt mein Dank. Mit ihnen habe ich zahlreiche Stunden am Schreibtisch mit dem Verfassen der Monografie verbracht und mich neben persönlichem auch wissenschaftlich ausgetauscht. Sie haben mich zum Ende der Arbeit motiviert das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren und mich immer unterstützt. Zuletzt möchte ich mich von tiefsten Herzen bei meiner Familie und besonders bei meinen Eltern bedanken, die es mir erst ermöglicht haben, mich in der Forschung auszuprobieren und mir bedingungslosen Rückhalt geboten haben. Sie haben immer an mich geglaubt und mich selbst an mich glauben lassen. Danke!



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Danßmann, Clara

Emailadresse: clara.danssmann@charite.de

Matrikelnummer: 220161

PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. med. Johannes H. Schulte

Promotionsinstitution / Klinik: Klinik für Pädiatrie m.S.

Onkologie und Hämatologie

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass *Frau Clara Danßmann* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- *Termin 1: 28.07.2021*

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Die statistischen Methoden sind angemessen für eine Monographie
- Ergebnisse der angewandten Methoden müssen vollständig dargestellt werden
- Auf Tabellen und Grafiken muss im Text entsprechend verwiesen werden

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 30.07.2021

Name des Beraters/ der Beraterin: Bianca Materne

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel